

A glükokortikoid receptor izoformáinak szerepe a transzkripció szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Nagy Zsolt

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Bhattoa Harjit Pál, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Masszi András, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora, tudományos főmunkatárs
Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

Bevezetés

I.	Irodalmi áttekintés.....	8
I.1.	A glükokortikoid hormonok és élettani hatásai.....	8
I.2.	A glükokortikoid receptor (GR)	11
I.2.1.	A GR szerkezete.....	11
I.2.2.	A GR poszttranszlációs módosulása	12
I.2.3.	A GR jelátviteli út	13
I.2.4.	A GR izoformák	16
I.2.5.	A GR β izoforma jelentősége egyes betegségekben	19
I.3.	A glükokortikoidok szerepe gyulladásos bélbetegségekben (IBD)	20
I.3.1.	Az IBD klinikai megjelenése és terápiája	20
I.3.2.	A gyulladásos bélbetegségek patogenezise	22
I.3.3.	A glükokortikoidok gyulladásgátló hatása és a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásának mechanizmusai IBD-ben.....	25
I.4.	A glükokortikoidok szerepe a cirkadián óra szabályozásában.....	27
I.4.1.	A cirkadián óra	27
I.4.2.	A cirkadián óra molekuláris mechanizmusa	28
I.4.3.	A perifériás cirkadián óra szabályozása	29
I.4.4.	A cirkadián óra klinikai jelentősége	30
II.	Célkitűzések	34
III.	Módszerek	35
III.1.	A GR β izoforma vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben (IBD)	35
III.1.1.	Sejtenyészetek	35
III.1.2.	Stabil GR β termelő Caco-2GR β sejtvonal létrehozása.....	35
III.1.3.	Sejtprolifерáció vizsgálata	36
III.1.4.	Immuncitokémia.....	36
III.1.5.	Luciferáz riporter assay	37
III.1.6.	Valós idejű PCR	37
III.1.7.	Microarray kísérletek.....	38
III.1.8.	Elérhető microarray alapú génexpresszió adatok meta-analízise	38
III.1.9.	Pathomechanizmus és útvonalelemzés	39
III.1.10.	Statisztikai módszerek	39
III.2.	A GR izoformák vizsgálata a perifériás cirkadián óra szabályozásában	42

III.2.1. Sejttenyészet	42
III. 2.2. Cirkadián kísérletek	42
III. 2.3. Valós idejű PCR	42
III.2.4. Tranziens transzfekció	43
III.2.5. Statisztikai módszerek	43
IV. Eredmények.....	45
IV.2. A GR izoformák vizsgálata a perifériás cirkadián óra szabályozásában.....	55
IV.2.1. A szérumból sokk szinkronizáló hatásának vizsgálata H295R sejtvonalon....	55
IV.2.2 Az óragének GR α függő transzkripciós szabályozása és az elsődleges GR α célpontok azonosítása H295R sejtekben	56
IV.2.3. Az óragének transzkripciós ritmusának vizsgálata H295R sejtekben.....	60
IV.2.4. A GR β túltermelés hatása az óragének transzkripciójára.....	61
IV.2.5. A H295R sejtek által termelt szteroidok nem befolyásolják a <i>PER1</i> gén indukcióját	62
V. Megbeszélés	64
V.1. A GR β szerepe a gén transzkripció szabályozásában.....	64
V.2. A fokozott GR β expresszió szerepe a gyulladásos bélbetegségekben.....	66
V.3. Az óragének és a teljes <i>GR</i> ritmikus transzkripciójának vizsgálata H295R sejtekben	67
V.4. A GR α és GR β izoformák jelentősége az óragének transzkripciójának szabályozásában.....	69
VI. Következtetések	72
VII. Összefoglalás.....	73
VIII. Summary	74
IX. Irodalomjegyzék.....	75
X. Saját publikációk jegyzéke.....	95
XI. Köszönetnyilvánítás	96

Rövidítések jegyzéke

18S	18S riboszomális RNS
ACTB	béta-aktin
ACTH	adrenokortikotropin
AF1	aktivátor funkció 1
Akt1	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AP1	aktivátor protein 1
ARNTL (BMAL1)	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (bone morphogenetic-like protein 1)
AVP	vazopresszin (antidiuretikus hormon)
BCL2	B-cell lymphoma 2
BSA	borjú szérum albumin
CARD15 (NOD2)	caspase recruitment domain-containing protein 15, (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
CASP1	kaspáz 1
CBP	cAMP reszponzív szekvencia kötő protein
CD	Crohn betegség
CDH6	kadherin 6
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
CHI3L1	chitinase-3-like-1
ChIP	kromatin immunoprecipitáció
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
COL4A6	kollagén IV-es típus alfa 6
CPE	karboxipeptidáz E
CRH	kortikotropin felszabadító hormon (corticotropin releasing hormon)
CRY1	cryptochrome 1
CRY2	cryptochrome 2
CXCL1	C-X-C motívum kemokin ligand 1
CXCL2	C-X-C motívum kemokin ligand 2
CXCL3	C-X-C motívum kemokin ligand 3
CYP-40	cyclophilin-40
DBD	DNS-kötő domén
DEFB1	defenzin béta 1
DEX	dexametazon
DLG5	discs large homolog 5
DNS	dezoxiribonukleinsav
E-box	enhancer (serkentő) box
ECM	extracelluláris mátrix
FBS	főtális borjú szérum
FC	fold change
FKBP1/2	FK506-kötő protein
GABA	gamma amino vajsav

GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
GAPDH	glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GBS	glükokortikoid kötőhely
GEO	gene expression omnibus
GR (NR3C1)	glükokortikoid receptor (nukleáris receptor 3-as alcslád C csoport 1-es tag)
GRE	glükokortikoid reszponzív szekvencia
GRIP	glutamát receptor interacting protein 1
GR α	glükokortikoid receptor alfa
GR β	glükokortikoid receptor béta
GR γ	glükokortikoid receptor gamma
HDAC	hiszton deacetiláz
HLA	humán leukocita antigén
HPA tengely	hipotalamusz-agyalap mirigy-mellékvese tengely
HPRT1	hipoxantin-foszforiboziltranszferáz 1
HSD11B1	11-béta-hidroxyszteroid-dehidrogenáz 1
HSD11B2	11-béta-hidroxyszteroid-dehidrogenáz 2
Hsp	hősokk protein
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
IgA	immunglobulin A
IL	interleukin
IL1	interleukin 1
IL13	interleukin 13
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein
IL2	interleukin 2
IL23R	interleukin 23 receptor
IL4	interleukin 4
IL5	interleukin 5
IPA	ingenuity pathway analysis
I κ B	inhibitor kappaB
LARGE	like-glycosyltransferase
LBD	ligandkötő domén
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MDM-2	mdm-2 protoonkogén
MDR-1 (ABCB1)	multi drog rezisztencia fehérje 1
MET	metyrapon
mGR	membrán kötött glükokortikoid receptor
MHC	fő hisztokompatibilitási rendszer (major histocompatibility complex)
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
NAD	nikotinsav-amid
NALP1	NLR family pyrin domain containing 1
NCoR 1	nukleáris receptor korepresszor 1
NCoR 2	nukleáris receptor korepresszor 2

NFIA	nukleáris faktor I A
NF- κ B	nukleáris faktor kappa B
nGRE	negatív glükokortikoid reszponzív szekvencia
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NNMT	nikotinamid-N-metiltranszferáz
NR3C1	nuclear receptor 3 class 1 (glükokortikoid receptor)
p300	hiszton-acetiltranszferáz p300
p38-MAPK	p38-mitogén aktivált protein kináz
PAH	fenilalanin-hidroxiláz
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázat
PAS	period-arnt single
PCOS	policisztás ovárium szindróma
PCR	polimeráz láncreakció
PDE4A	foszfodiészteráz 4A
PER1	period 1
PER2	period 2
PER3	period 3
PK2	prokineticin 2
PMBC	perifériás vér mononukleáris sejt
POMC	proopiomelanokortin
PRR	mintázat felismerő receptor (pattern recognition receptor)
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
RBMS3	RNA binding motif single stranded interacting protein 3
REV-ERB α (NR1D1)	nukleáris recetor 1-es alcsalád D csoport 1-es tag
RHOBTB1	rho related BTB domain containing 2
RICH2	rho GTPase activating protein 44
RNS	ribonukleinsav
RORE	retinsav-kapcsolt árva receptor reszponzív szekvencia
ROR α	RAR kapcsolt árva receptor
RPL39L	ribosomal protein L39 like
RU486	mifepriston
S100P	S100 kalciumkötő protein
SAMD1	sterile alpha motif domain containing 1
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9
SATB1	SATB homeobox 1
SCN	szuprakiazmatikus mag
SEAP	szekretált alkalikus foszfatáz
SLC22A4	solute carrier family 22 member 4
SLC22A5	solute carrier family 22 member 5
SLC26A9	solute carrier family 26 member 9
SPARC	oszteonektin

SPP1	oszteopontin
SRC1	SRC protoonkogén nem receptor tirozin-kináz
SSTR1	szomatosztatin receptor 1
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TFRC	transzferrin receptor
TGFB2	transforming growth factor beta 2
Th1	T-helper 1 sejt
Th17	T-helper 17 sejt
Th2	T-helper 2 sejt
TJ	tight junction
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
Treg	szabályozó T-sejt
TSS	transzkripció start hely
UC	colitis ulcerosa
VIM	vimentin
VIP	vazoaktív intesztinális peptid

Bevezetés

A glükokortikoidok számos élettani folyamatban nélkülözhetetlen szerepet játszanak és a leggyakrabban használt gyulladáscsökkentő gyógyszerek közé tartoznak. Az 1940-es években történt felfedezésük ellenére pontos hatásmechanizmusuk még mindig nem teljesen ismert. Sokáig úgy gondolták, hogy a glükokortikoid hormonok egyetlen nukleáris receptoron, a jól ismert glükokortikoid receptor α -án ($GR\alpha$) keresztül fejtik ki szerteágazó biológiai hatásukat. Az 1990-es években fedezték fel a $GR\beta$ izoformát, amelyet a későbbiekben más, eltérő izoformák leírása is követett. Napjainkban a molekuláris biológiai módszerek robbanásszerű fejlődésével a GR család számos új hatása kerül leírásra, melyek révén egyre komplexebb ismeretekkel rendelkezünk a szerteágazó biológiai folyamatokat szabályozó receptor működéséről.

Kutatásomban elsősorban a GR α és β izoformák géntranszkripcióban betöltött szerepét vizsgáltam molekuláris biológiai módszerekkel. A $GR\beta$ fokozott expresszióját mutatták ki számos autoimmun megbetegedésben, köztük gyulladásos bélbetegségekben (IBD), ezért munkám egyik részében Caco-2 bélhámsejtvonalból létrehozott *in vitro* modell segítségével jellemeztem a $GR\beta$ szerepét a betegségben.

A cirkadián óra a környezetünkhöz való ritmikus alkalmazkodást segíti és napszaktól függően számos biológiai folyamatot szabályoz. Majdnem az összes szervünkben megtalálható a perifériás cirkadián óra, amelyet az úgynevezett óragének közel 24 órás oszcillációt biztosító visszacsatolási köre alkot. A glükokortikoidok diurnális elválasztásuknak köszönhetően kiemelt szerepet játszhatnak az óragének szabályozásában. Kevésbé ismert azonban, hogyan befolyásolják a glükokortikoidok az óragének expresszióját, ezért munkám második részében a GR α és β izoformáknak a perifériás óragénekre gyakorolt szabályozó hatását elemeztem mellékvesekéreg sejtvonalon.

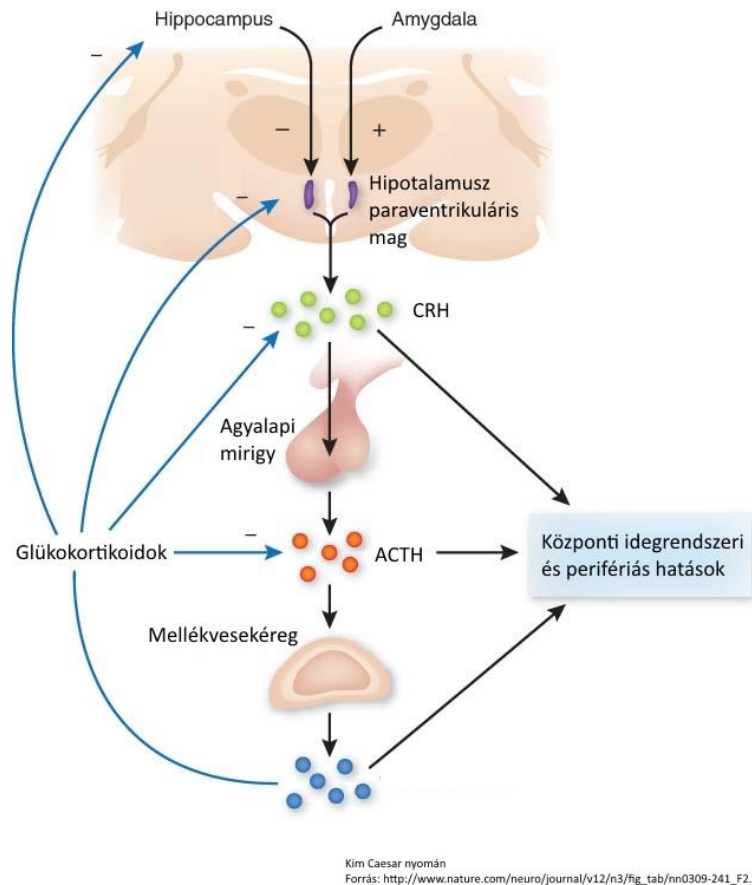
I. Irodalmi áttekintés

I.1. A glükokortikoid hormonok és élettani hatásaik

Az 1920-as években Kendall és munkatársai a mellékvesekéregből állatkísérletek során számos vegyületet izoláltak. A vegyületek közül a kezdeti kutatások elsősorban a kortizon (compound E) hatására fókuszáltak, melyet rheumatoid arthritisben adva drámai javulást értek el a betegek állapotában (1). A későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy a hatás nem az inaktív kortizonnak, hanem a szervezetben belőle kialakuló, biológiailag aktív kortizolnak (compound F) volt köszönhető. A szervezetben a glükokortikoidok szintézise a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese (HPA) tengely szabályozása alatt a mellékvesekéregben történik (**1. ábra**).

A hipotalamusz paraventriculáris magjának kortikotropin felszabadító hormonja (CRH) serkenti az agyalapi mirigy adrenokortikotropin (ACTH) elválasztását, amely fokozza a mellékvesekéreg glükokortikoid szintézisét. A glükokortikoidok negatív feedback mechanizmussal gátolják a CRH és ACTH elválasztást (2–4). A mellékvesekéreg szövettanilag és funkcionálisan három részre osztható; a zona fasciculata rétegben a glükokortikoidok, a zona glomerulosa rétegben a mineralokortikoidok, míg a zona reticularis rétegben az androgén hormonok termelődnek (5).

A glükokortikoidok szerteágazó élettani hatásokkal rendelkeznek. Nélkülözhetetlenek a stressz válasz kialakulásában és fontos szerepet töltenek be a fehérje-, szénhidrát-, és zsírsanyagcsere szabályozásában, a növekedésben, az immunológiai és gyulladásos folyamatokban, a só- és vízháztartás szabályozásában, a kardiovaszkuláris, valamint központi idegrendszeri funkciókban. A metabolizmusban a glükokortikoidok fokozzák a fehérjék lebontását, a glükoneogenezis serkentése és a glükóz felhasználás csökkentése révén emelik a vércukorszintet, valamint elősegítik a lipolízist. Igen fontos a glükokortikoidok gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatása, gátolják a sejtszintű immunválaszt és csökkentik a proinflammatorikus citokinek termelődését. Gyulladásgátló hatásukat széles körben alkalmazzák több betegség kezelésében.



1. ábra A HPA tengely szabályozása

(www.nature.com/neuro/journal/v12/n3/fhg_tab/nn0309-241_F2.html) alapján

A fokozott glükokortikoid termelés és a tartós glükokortikoid kezelés azonban sajnos számos kedvezőtlen mellékhatással is jár (**1. táblázat**). Klinikailag a diabetogén állapot, csonttritkulás, idegrendszeri zavarok, impotencia és a fertőzésekre való hajlam fokozódása a legjelentősebbek (5).

A glükokortikoid hormonok szérumban szintje dinamikus mintázatot mutat. A legismertebb a kortizol cirkadián (diurnális) elválasztása, amely emlősökben a biológiailag aktív napszak kezdetén, emberben a hajnali órákban, ébredés előtt éri el maximumát. Megfigyelhető ugyanakkor a kortizol körülbelül óránkénti frekvenciával, változó amplitúdóval történő ultradián felszabadulása is. A szekréció pulzatis mintázata valószínűleg fontos szerepet tölt be a megfelelő glükokortikoid-érzékenység fenntartásában (4,6). Érdekes módon pulzatis glükokortikoid kezelés során ciklikus

génttranszkripció indukálódik, amelynek mintázata különbözik a folyamatos kezelés után megfigyelhető módosulásoktól (7).

1. táblázat A glükokortikoidok mellékhatásai

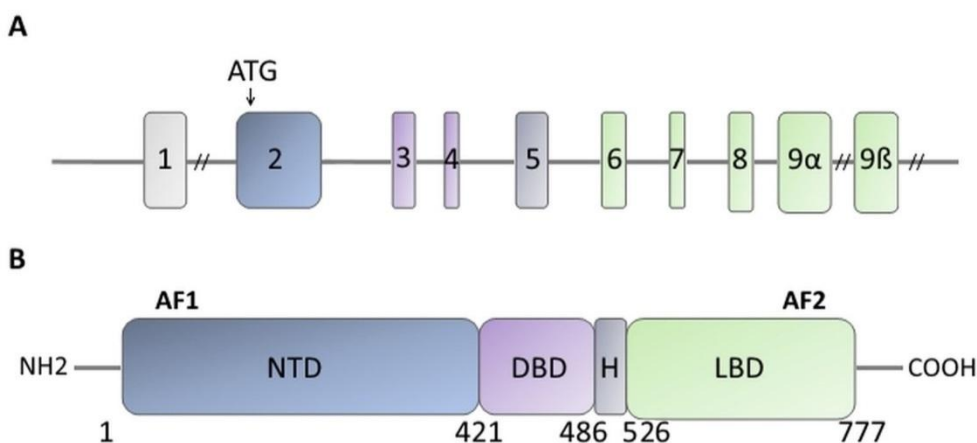
Szervrendszer/szerv	Mellékhatás
Központi idegrendszer	<ul style="list-style-type: none"> • Depresszió • Pszichózis • Fejfájás • Fokozott görcskészség • Fokozott intrakraniális nyomás
Szem	<ul style="list-style-type: none"> • Glaukóma • Katarakta
Immunrendszer	<ul style="list-style-type: none"> • Fokozott fertőzés hajlam • Immunszuppresszió
Kardiovaszkuláris rendszer	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertónia • Hipokalémia
Gasztrointesztinális rendszer	<ul style="list-style-type: none"> • Gyomorfekély
Anyagcsere	<ul style="list-style-type: none"> • Diabétesz • Centrális elhízás • Hiperlipidémia
Gonádok	<ul style="list-style-type: none"> • Impotencia • Oligomenorrea
Csontrendszer és vázizomzat	<ul style="list-style-type: none"> • Csontritkulás • Izomgyengeség • Növekedés elmaradása
Bőr	<ul style="list-style-type: none"> • Plethora • Livid striák • Elvékonyodott bőr • Csökkent sebgyógyulás • Akne

Számos kórképben zavart szenved a glükokortikoid elválasztás mintázata, többek között Cushing-szindrómában, depresszióban, obstruktív alvási apnoében, immunológiai betegségekben, PCOS-ben, abdominális elhízásban, sőt akut és krónikus stresszhatás következtében is (4,7–13). További fontos problémát jelent, hogy azokban a betegségekben, amelyek tartós glükokortikoid kezelést igényelnek, a terápia során nem tudjuk utánozni a hormon ultradián felszabadulását. A glükokortikoidok megváltozott ritmusa hozzájárulhat a kedvezőtlen mellékhatások kialakulásához.

I.2. A glükokortikoid receptor (GR)

I.2.1. A GR szerkezete

A glükokortikoidok biológiai hatásait a nukleáris receptor családba tartozó GR-on (NR3C1) keresztül fejtik ki. A GR cDNS struktúráját először 1985-ben Hollenberg és munkatársainak sikerült izolálnia (14). A *GR*-t kódoló gén az 5. kromoszómán helyezkedik el és 9 exon alkotja (15,16). Az 1. exon az 5' nem transzlálódó régiót kódolja, a GR fehérje N-terminális része a 2. exonról íródik át. A 3 és 4-es exonok kódolják a DNS-kötésért felelős cink ujjas motívumokat, míg a többi exon a ligand-kötésért felelős struktúrákat alkotja. A 9-es exon alternatív splicingja (9 α és 9 β) következtében két eltérő tulajdonságú ligand kötő domén jöhet létre (15) (**2.A ábra**).



2. ábra (A) *GR* gén szerkezete. **(B)** GR fehérje szerkezete. Rövidítések: NTD, N-terminális domén; DBD, DNS-kötő domén; H, hinge régió; LBD, ligandkötő domén; AF1, aktivátor funkció 1; AF2, aktivátor funkció 2

A GR fehérje szerkezetileg 3 fő doménből áll (**2.B ábra**). Az 1-421 aminosavak alkotják az N-terminális domént, mely a transzaktivációs hatásért felelős aktivációs faktort (AF1) tartalmazza. Az AF1 ligand hiányában is számos transzkripciós kofaktort képes interakcióba lépni és több foszforilációs szabályozóhelyet tartalmaz. 65 aminosav alkotja a DNS-kötő domént (DBD), amely a receptor középső régiójában

helyezkedik el és a DNS-kötésen kívül fontos szerepet tölt be a receptor dimerizációjában is. Itt helyezkedik el a receptor sejtmagba történő transzportjáért felelős egyik nukleáris lokalizációs aldómen (NLS1). A DBD ezen kívül képes interakcióba lépni más proteinekkal is (17–19). A C-terminális domént egy 40 aminosavból álló ún. hinge régió köti össze a DBD-nel. A hinge domén egy flexibilis régió, amelynek a dimerizációban és a DNS-kötést követő megfelelő konformáció kialakításában van szerepe (20). Az 527-777 aminosavak alkotják a ligandkötő domént (LBD). A régióban található egy második nukleáris lokalizációs szignált (NLS2) tartalmazó motívum. Az LBD a chaperon kötődésben, valamint a receptor dimerizációban is szerepet játszik. Ligandkötést követően aktiválódik az LBD-ben elhelyezkedő AF2 aldómen, amely további koaktivátor és korepresszor fehérjék kötődését teszi lehetővé (17–19,21).

I.2.2. A GR poszttranszlációs módosulása

A GR fehérje számos poszttranszlációs módosuláson mehet keresztül, melyek megváltoztatják a receptor sejten belüli lokalizációját, élettartamát és transzkripciós aktivitását. Ezek közül a foszforilációs szabályozás a legjobban ismert, eddig legalább 6 különböző kinázt és számos foszfatazt ismerünk, amely befolyásolja a GR foszforilációs mintázatát (20). Ligandkötést követően a GR foszforilációs mintázata megnövekszik. A foszforilációs helyek az AF1 aldómenben helyezkednek el és befolyásolhatják a GR transzkripciós aktivitását. A Ser211 foszforilációjáról kimutatták, hogy elősegíti a DRIP/TRAP koaktivátor komplex kötődését, ezáltal fokozza a GR transzkripciós aktivitását (18). A Ser226 és Ser404 aminosavak foszforilációja ugyanakkor a fokozott nukleáris export következtében csökkenti a GR transzkripciós aktivitását (20).

További poszttranszlációs szabályozásra ad lehetőséget a fehérjék ubiquitin és small ubiquitin-like modifier (SUMO) molekulákkal történő összekapcsolása. Az ubiquitin-proteasóma útvonal fontos szerepet tölt be a fehérjék lebontásában, míg a SUMO jelölés elsősorban a fehérje stabilitást, a sejten belüli lokalizációt, a transzkripciós aktivitást és a fehérje-fehérje interakciót képes befolyásolni. A GR fehérjében eddig legalább egy ubiquitin és három SUMO jelölőhelyet azonosítottak, melyeken keresztül a receptor szabályozódhat (17). A közelmúltban Nader és munkatársai kimutatták, hogy a GR acetiláció útján is képes szabályozódni. A molekuláris cirkadián óra egyik

komponense, a CLOCK:BMAL1 heterokomplex a GR hinge régiójának acetilálása következtében gátolja a GR transzkripció aktivitását (22).

1.2.3. A GR jelátviteli út

1.2.3.1. A GR genomiális hatásai

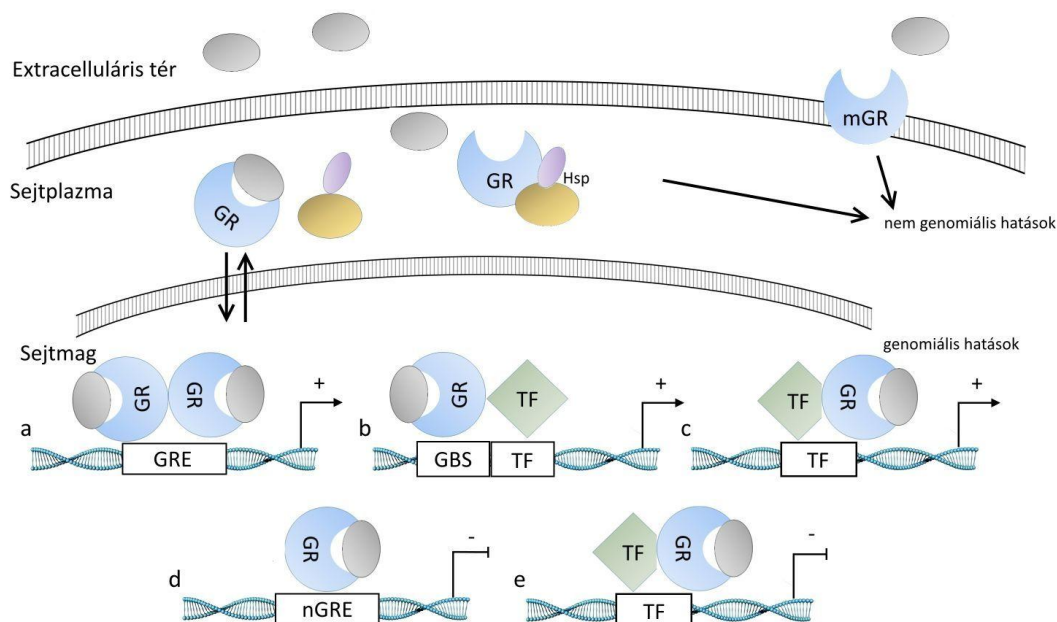
A szteroid hormonok passzívan képesek a sejtmembránon áthatolni, majd a megfelelő nukleáris receptorhoz kapcsolódva fejtik ki transzkripció hatásait. A GR ligand hiányában, a sejtplazmában, egy több fehérjéből álló heterokomplexhez kapcsolódva helyezkedik el. A komplex tagjait többek között hősokk-fehérjék (hsp70, hsp90), a p23 chaperon és immunophilinok (FKBP51, FKBP52, CYP-40) alkotják (23). A komplex fontos szerepet tölt be a GR hormonszükségletre alkalmas konformációjának kialakításában és nukleáris transzportjában (24). Ligandkötést követően a GR konformációja megváltozik, disszociál a heterokomplextől, majd a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagon belül a GR homodimert alkotva direkt DNS-kötődés által vagy más transzkripció faktorokkal történő interakciókon keresztül szabályozza a célgének expresszióját (3. ábra).

A glükokortikoid hatás következtében indukálódó gének promoterében általában megtalálható glükokortikoid-érzékeny szekvencia (GRE), melyet 3 bázispár által elválasztott palindrom hexamer szekvenciák, jellemzően AGAACAnnnTGTTCT nukleotid sorrend alkot (3,17). Újabb kutatások alapján a GR monomerként is aktiválhat olyan géneket, melyben a palindrom GRE szekvencia egyik fele (half-site GRE) van jelen (25). Ráadásul egyes gének transzkripcióját a GR monomerként közvetlenül is gátolhatja az úgynevezett negatív GRE (nGRE) szekvenciákon keresztül (26). Kromatin immunoprecipitációs (ChIP) vizsgálatok alapján a GR nem képes a genomban található számos GRE kötőhely mindegyikét elfoglalni (20). A nyitott kromatinállomány sejt-specifikus mintázata befolyásolja a glükokortikoid kötőhelyek (GBS) hozzáférhetőségét, ezáltal szabályozhatja a glükokortikoidok szövetspecifikus hatásait (27). A glükokortikoid kötőhelyek gyakran a transzkripció start helytől (TSS) egészen távol, akár több mint 10kb távolságra helyezkednek el. Érdekes módon az indukálódó gének esetében inkább proximális, míg a repressziót mutató gének esetében disztális

GR kötődési tendencia figyelhető meg (28,29). A genomon belül az egyes gének eltérő glükokortikoid-érzékenységgel rendelkeznek. Bizonyos gének már egészen alacsony koncentrációjú glükokortikoid kezelésre is reagálnak, míg más gének transzkripciója csak nagyobb dózist követően változik meg. A génspecifikus GR rezponzivitás hátterében a kromatinállomány hozzáférhetősége és a receptor GBS-ok közelében elhelyezkedő egyéb transzkripciós faktorokkal történő interakciója állhat (30). Számos nukleáris kofaktor képes fokozni (CBP, p300, SRC1 és GRIP) vagy éppen gátolni (N-CoR1, N-CoR2, HDAC, szirtuin) a GR transzkripciós aktivitását (29).

ChIP vizsgálat alapján a GR számos olyan DNS szakaszokhoz is kötődik, amely nem tartalmaz klasszikus GRE szekvenciákat. Ezekben az esetekben a GR más transzkripciós faktorok segítségével képes kötődni jellemzően inkomplett GRE szekvenciákhoz és ezáltal serkenteni vagy gátolni a transzkripciót. Ezeket az összetett kötőhelyeket kompozit szekvenciáknak nevezzük. A GBS-ek közelében leggyakrabban aktivátor protein 1 (AP1) kötőhely azonosítható, amely a GR receptor egyik jól ismert kofaktora (28). Az AP1 segít fellazítani a kromatinállományt, ezáltal elősegíti a GR kötődését a DNS-hez (31).

A GR DNS-kötődés nélkül, protein-protein interakción keresztül is képes szabályozni a transzkripciót. Ezek közül a legismertebb a GR-nak a NF- κ B és az AP1 transzkripciós aktivitásának gátlásán keresztül kifejtett gyulladáscsökkentő hatása. A GR fehérjén végzett mutációs vizsgálatok alapján a DBD fontos szerepet tölt be a transzrepresszió kialakulásában (29,32). Kevésbé ismert, de a GR aktiváló hatást is kifejthet más fehérjékkel történő interakció által. Ezek közé tartozik a GR-STAT5 szinergista hatása a májsejtek glükokortikoid-függő növekedésében és érésében (33).



3. ábra A GR genomiális és nem genomiális szabályozó mechanizmusainak egyszerűsített sémája. Az aktivált GR serkenti a transzkripciót **(a)** direkt GRE-hez történő kötődés, **(b)** kompozit DNS szekvenciákhoz való kötődés, **(c)** transzkripciósfaktorral történő direkt vagy indirekt fehérje-fehérje interakció által. Az aktivált GR gátolhatja a transzkripciót **(d)** nGRE-hez történő kötődés, **(e)** más transzkripciósfaktorral történő direkt vagy indirekt fehérje-fehérje interakció által (Ratman, 2013 nyomán). Rövidítések: GR, glükokortikoid receptor; mGR, membránkötött glükokortikoid receptor; Hsp, hő sokk proteinek; TF, transzkripciósfaktor; GRE, glükokortikoid reszponzív szekvencia; GBS, glükokortikoid receptor kötőhely; nGRE, negatív glükokortikoid reszponzív szekvencia

Újabban a GR-nak egy korábban nem ismert poszttranszkripcionális szabályozó hatása is leírásra került. Az aktivált GR serkenti a cink ujjas tristetraprolin fehérje (TTP) szintézisét, amely destabilizálja számos gyulladásos mediátor mRNS-ét, ezáltal fokozva lebontásukat (34). Ishmael és munkatársai továbbá megfigyelték, hogy a GR direkt módon is képes befolyásolni egyes gének mRNS-ének stabilitását. Budesoniddal kezelt humán légúti laphámsejtekben a GR csökkentette a CCL2 és CCL7 mRNS-ek félélettidejét. Az aktivált GR az 5'UTR régió GC gazdag motívumához kapcsolódva fejtette ki hatását és motívumkötődési predikciós vizsgálatok alapján akár több ezer transzkriptum mRNS-ének stabilitását is befolyásolhatja (35).

1.2.3.1. A GR nem genomiális hatásai

A glükokortikoidok nem csak a géntranszkripciót képesek befolyásolni, hanem a sejten belül azonnali, nem genomiális válaszokat is létrehozhatnak. A glükokortikoidok a membránfluiditást, a sejtproliferációt, a gyulladásos és immunválaszt, a sejten belüli ionháztartás-szabályozást, valamint központi idegrendszeri folyamatokat is képesek nem genomiális úton befolyásolni (36). Többek között a glükokortikoidok HPA rendszerre kifejtett negatív feedback-je is feltételezhetően nem genomiális módon történik (36,37). A glükokortikoidok nem genomiális hatásainak hátterében álló molekuláris mechanizmusok kevésbé ismertek. A membránfluiditást a glükokortikoidok a GR közvetítő hatása nélkül képesek szabályozni, míg más esetekben a GR heterokomplexből a ligandkötést követően felszabaduló fehérjék kináz aktivitása hoz létre azonnali változásokat (36,38). A nem genomiális hatások létrejöttében az 1990-es években felfedezett membránhoz kötött glükokortikoid receptorok (mGR) is szerepet játszhatnak. Az endoplazmatikus retikulumban a GR olyan poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül, amelyek elősegítik a sejtmembránba épülését, azonban az mGR jelátviteli mechanizmusáról egyelőre még keveset tudunk (39). A közelmúltban fedezték fel, hogy a mGR glükokortikoid kötést követően aktiválja a p38-MAPK útvonalat, melyen keresztül számos sejten belüli folyamatot szabályozhat (3,39).

I.2.4 A GR izoformák

Sokáig úgy gondolták, hogy a glükokortikoidok egyetlen GR fehérjén keresztül fejtik ki hatásukat. A klasszikusan ismert glükokortikoid hatások a számos szövet- és sejttypusban megtalálható GR α közvetítésével jönnek létre. Ma már tudjuk, hogy az mRNS feldolgozás során az alternatív splicing és transzláció következtében számos egyéb GR izoforma is létrejöhet. Az egyes izoformák különböző transzkripciós aktivitással rendelkeznek és eltérő génkészleteket szabályozhatnak (40).

1.2.4.1. A GR β izoforma

Az 1990-es évek elején fedezték fel, hogy a *GR* gén 9-es exonjának alternatív splicingja következtében a GR α mellett egy másik izoforma, a GR β is keletkezhet. A két izoforma az első 727 aminosavig megegyezik egymással, azonban a C-terminális végük különbözik. Az alternatív splicing következtében a GR β izoformát további 15 eltérő aminosav beépülésével 742 aminosav alkotja, míg a GR α összesen 777 aminosavból áll. Az így kialakuló megrövidült C-terminális következtében a GR β nem képes glükokortikoid-kötésre. A GR β nem képes a GRE tartalmazó promoterek transzkripcióját indukálni, azonban domináns negatív gátló hatást fejt ki a GR α aktivitásra (41–43). Csonkolásos vizsgálatok során, ha a GR β C-terminális végét alkotó 15 egyedi aminosavat eltávolítjuk, az így keletkezett csonkolt receptor továbbra sem képes DEX kötésre, azonban megszűnik a GR α -ra kifejtett gátló hatása (42). További vizsgálatok a GR β LBD-jének gátló hatását mindössze két β -izoforma specifikus aminosav jelenlétére szűkítették (44). A GR β expressziója a GR α -nál kisebb mennyiségben, de szintén számos szövetben kimutatható. Sejt- és szövetspecifikus módon a sejten belül elsősorban a sejtmagban helyezkedik el, azonban a citoplazmában is megtalálható (45). Kimutatták, hogy a GR β sejtmagi lokalizációja szükséges a GR α antagonist hatás kialakulásához (44). A GR β többféle mechanizmus útján képes gátolni a GR α funkciót. Mivel mindkét izoforma rendelkezik DBD-nel, ezért a GR α versenghet az inaktív GR β -val a GRE kötőhelyekért, továbbá egymással összekapcsolódva inaktív GR α -GR β heterodimereket is létrehozhatnak (41,42,46). Ezen kívül a GR β az AF1 doménjén keresztül megkötheti a p160 koaktivátor komplex tagjait, többek között a GRIP1 koaktivátort, így kompetitív módon képes gátolni a GR α transzkripciós aktivitását (47).

Az elmúlt években egyre több kutatás támasztja alá, hogy a GR β szabályozó hatása nem kizárólag a GR α gátláson keresztül valósul meg. Teljes genom génexpressziós vizsgálatok alapján a GR β izoforma a GR α hiánya esetén is képes szabályozni a géntranszkripciót (48). A GR β túltermelés hatására a GR α -tól eltérő gének expressziója változik meg (49,50). Mindezek alapján a GR β önálló, a GR α -tól független transzkripciós aktivitással is rendelkezik. Ennek a mechanizmusa kevésbé ismert, mivel a GR β nem képes glükokortikoid kötésre és a klasszikus GRE szekvenciákat sem képes

indukálni. Lewis-Tuffin és munkatársai ugyanakkor kimutatták, hogy a nem specifikus GR antagonistá RU486 képes kötődni a GR β -hoz, ráadásul fokozza a receptor sejtmagba történő transzlokációját. Mindezen kívül úgy tűnik, hogy az RU486 inkább gátolja a GR β önálló transzkripciós aktivitását (48). A GR β RU486 kötő képessége ugyanakkor ellentmondásos, mivel egy későbbi tanulmányban nem sikerült az előző megfigyeléseket megerősíteni (49). A GR β túltermelés által szabályozott gének többségében nem található klasszikus GRE, így a GR β önállóan elsősorban nem a hagyományos glükokortikoid reszponzív géneket szabályozza. Elképzelhető, hogy a GR β fehérje-fehérje interakción, vagy más transzkripciós faktorokon keresztül fejt ki önálló szabályozó hatását. Ezt támasztja alá, hogy a GR β AF1 doménjével a GR α -hoz hasonlóan interakcióba léphet más transzkripciós komplexekkel (45). Kelly és munkatársai kimutatták, hogy a GR β képes kapcsolódni a hiszton-deacetiláz 1-hez (HDAC1) és a HDAC-k közvetítésével gátolja az *IL5* és *IL13* gének expresszióját (51). A közelmúltban került felfedezésre, hogy a GR β a *PTEN* transzkripció és az Akt1 foszforiláció szabályozásán keresztül képes fokozni az inzulin stimulálta növekedési útvonalat (52). Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a GR β , a GR γ izoformához hasonló módon, egyelőre nem ismert GRE-szerű, GR β specifikus szekvenciákat képes aktiválni (45,53).

1.2.4.2. A GR γ izoforma

A GR γ izoforma alternatív splicing következtében, a klasszikus GR α -tól mindössze egyetlen, a DBD-ben elhelyezkedő arginin aminosav inzercióban különbözik (54). A GR γ is számos szövetben expresszálódik, a teljes GR transzkripció körülbelül 4-8%-át teszi ki.(20). A γ -izoforma glükokortikoid kötést követően a GR α -nál gyengébben, de képes aktiválni a GRE-t tartalmazó promotereket (55). Glükokortikoid kezelést követően a GR γ számos gént a GR α -hoz hasonlóan szabályoz, azonban microarray vizsgálatok alapján GR α - és GR γ -specifikus géneket is azonosítottak. Kimutatták, hogy az aminosav inzerció következtében megváltozik a fehérje szerkezete, ezáltal részben megváltozik a receptor DNS-kötő preferenciája (53). Érdekes módon azonban a GR γ egyidejű expressziója a GR α -val megszüntette a glükokortikoidok nukleáris faktor κ B-n

(NF- κ B) keresztül kifejtett gyulladásgátló hatását, ezáltal szerepet játszhat a glükokortikoidok elleni rezisztencia kialakulásában (55).

1.2.4.3. Egyéb GR izoformák

Az mRNS feldolgozás során további izoformák is keletkezhetnek, melyek jelentőségéről és hatásáról egyelőre kevés ismerettel rendelkezünk. A GR-A izoformában hiányoznak az 5-7 exonok, a GR-P izoforma a 8-9-es exonok deléciója, míg a GR- δ izoforma a 2-es exonon belüli deléció következtében jön létre. A GR-P megnövekedett expresszióját mérték többek között hematológiai betegségekben és kissejtes tüdőkarcinómában (20). A GR-S1 és GR-DL1 izoformák csonka fehérjéket kódolnak és transzaktivációs képességük csökkent. A közelmúltban felfedezett GR-NS1 izoforma ugyanakkor megnövekedett aktivitással rendelkezik (20).

A 2-es exonon belül található eltérő translációs iniciációs helyek következtében a GR α -nak legalább 8 különböző fehérje izoformája (GR α -A, B, C1, C2, C3, D1, D2 és D3) keletkezhet, melyek közül a GR α -A kódolja a teljes, 777 aminosav hosszúságú receptort. Az egyes fehérje izoformák szövet specifikus módon expresszálódnak, különböző a sejten belüli lokalizációjuk és eltérő transzkripciós aktivitással rendelkeznek (17). Feltételezhetően a többi mRNS izoforma is rendelkezik az előbb ismertetett alternatív translációs helyekkel, így a glükokortikoidok hatását számtalan GR translációs izoforma közvetítheti. A különböző izoformák szövetspecifikus expressziója és heterogén funkcionális tulajdonságai részben magyarázatul szolgálhatnak a glükokortikoidok komplex és sokrétű biológiai hatásaira (40).

1.2.5. A GR β izoforma jelentősége egyes betegségekben

A GR β izoforma expressziója számos sejt- és szövettípusban (neutrofil granulocita, monocita, vázizomzat, máj, vese, tüdő, szív, agy, ornyálkahártya) kimutatható, azonban a GR α -hoz képest kb. 400-szor kisebb mértékben (56). Ennek megfelelően az egyes szövetekben a GR β fehérje igen kevés mennyiségben, vagy egyáltalán nem detektálható (56,57). A GR β fiziológiai szerepe nagyrészt ismeretlen, azonban figyelemre méltó, hogy az evolúció során az emberi változattól függetlenül zebrahalsban is kialakult egy a

humán GR β -nak megfelelő GR izoforma. Ezen kívül a közelmúltban egerek májában is sikerült azonosítani a GR β izoformát, és a kísérletek felvetették szerepét az anyagcsere szabályozásában (45,58).

Érdekes módon asztmában, egyes autoimmun betegségekben és leukémiában is emelkedett GR β expresszió mutatható ki, amely összefüggést mutatott a szöveti szteroid-rezisztencia kialakulásával (59). Glükokortikoid-inszenzitív asztmás betegek bronchiális mosófolyadékából származó makrofágokban, légúti T-sejtekben és perifériás vér mononukleáris sejtekben (PMBC) is emelkedett GR β expressziót mutattak ki (60–62). Ehhez hasonlóan, szteroid-rezisztens rheumatoid arthritisben, Crohn betegségben és ulceratív colitisben szenvedő betegek PMBC-ben is emelkedett GR β expressziót találtak a glükokortikoidokra jól reagáló betegekhez képest (63–65).

Egyes proinflammatorikus citokinek, például interleukinok, TNF α és interferonok képesek indukálni a GR β expressziót (45). Webster és Leung vizsgálataik során megállapították, hogy citokinek hatására fokozódik a GR β expresszió és a megnövekedett GR β /GR α arány korrelált a sejtek glükokortikoid-érzékenységgel (61,66). Ezen kívül akut és krónikus limfoid leukémiában az emelkedett GR β /GR α arány megakadályozta a daganatos sejtek glükokortikoid indukált apoptózisát (67,68). Egyes szerzők ugyanakkor megkérdőjelezték a GR β szerepét a szteroid-rezisztencia kialakulásában. Néhány sejttypusban nem sikerült megfigyelni a GR β GR α -t antagonizáló hatását, továbbá az *in vitro* kísérletekben a GR α -hoz képest legalább 5-szörös GR β többletre volt szükség a gátló hatás kifejtéséhez, míg élő szervezetekben a GR β expresszió mindössze töredéke a GR α -nak. A génexpresszió mértéke ugyanakkor nem feltétlenül korrelál a fehérje mennyiséggel, azonban jelenleg nem rendelkezünk átfogó vizsgálatokkal, amelyek a GR β fehérjét vizsgálják szteroid-érzékenység tükrében. (69).

I.3. A glükokortikoidok szerepe gyulladásos bélbetegségekben (IBD)

I.3.1. Az IBD klinikai megjelenése és terápiája

Az IBD elsődleges jellemzője a tápcsatorna krónikus gyulladásos elváltozása. Leggyakrabban fiatal felnőttkorban és a hatvanas éveikben jelentkezik. A betegség tünetei közé tartozik a krónikus hasmenés, az étvágytalanság, a hányinger és gyakran a

hasi fájdalom is. Klinikai és szövettani sajátosságok alapján az IBD két csoportra, Crohn betegségre (CD) és colitis ulcerosa-ra (UC) osztható. A CD leggyakrabban a terminális ileum és vastagbél szakaszát érinti, de a tápcsatorna egészén előfordulhat. Jellemzője a bélfal transzmurális gyulladása, melynek következményeként gyakorta a bélnyálkahártyán elszórtan fekélyek, bélszűkület, fisztulázó sipolyok alakulhatnak ki. Az UC elsősorban a disztális vastagbél nyálkahártyájának gyulladásos elváltozása. A nyálkahártyán felületes eróziók, petechiák, fekélyek figyelhetők meg. Előrehaladott esetekben a bélfal atrófiássá válik, elveszíti redőit, csöszserűvé válik, pszeudopolipusok, ritkán toxikus megacolon alakulhat ki. Az IBD-t az esetek egy részében extraintesztinális bőr (erythema nodosum, pyoderma), szem (uveitis) és ízületi (arthritis) tünetek is kísérhetik (70). A betegség klinikai aktivitása hullámzó, az első panaszok megjelenését követően akár évekig remisszióban maradhat a betegség, máskor gyakori relapsusok okozhatnak súlyos panaszokat.

Az IBD-ben kialakuló szekunder laktóz-intolerancia és malnutritio miatt fontos lehet diétás étrend kialakítása és a vitaminok, ásványi anyagok megfelelő bevitele. Az IBD gyógyszeres kezelésében jelenleg kétféle stratégiát alkalmaznak. A hagyományos „step-up” megközelítés szerint a terápiát a kevesebb mellékhatással rendelkező, ám kevésbé hatékony gyógyszerekkel indítjuk. Ezek hatástalansága esetén további hatékonyabb, ugyanakkor potenciálisan toxikus mellékhatásokkal rendelkező gyógyszerekkel, fokozatosan egészítjük ki a terápiát. Első lépésként az aminoszalicilát származékok alkalmazása javasolt, melyek a remisszió fenntartásában is szerepet játszhatnak. A tünetek rosszabbodása, vagy hatástalanság esetén szükségessé válhat glükokortikoidok (prednison, budesonide) alkalmazása. Kifejezett gyulladásgátló hatásuk ellenére a remisszió fenntartására nem alkalmasak, hosszú távú alkalmazásuk számos kedvezőtlen mellékhatással jár, illetve az esetek egy részében sajnos glükokortikoid-rezisztencia, illetve dependencia kialakulása figyelhető meg. Glükokortikoid-refrakter esetekben vagy adjuváns terápiaként immunszuppresszív szerek (azatioprin, mercaptopurin, methotrexat, ciclosporin, tacrolimus) alkalmazása jön szóba. A konvencionális terápiára nem reagáló esetekben TNF α elleni monoklonális antitestek (influximab, adalimumab) alkalmazására lehet szükség. Ugyanakkor egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a hagyományos kezelési stratégia nem megfelelő hatékonyságú, mivel a klinikai tünetmentességet nem feltétlenül kíséri a bélhám gyógyulása. A „top-down”

megközelítés célja, ezért hogy az immunszuppresszív szerek és a biológiai terápia korai alkalmazásával azonnali remissziót és a bélhám gyógyulását érjük el. A sebészeti beavatkozásoknak elsősorban a szövődmények kezelésében van jelentőségük. Bizonyos esetekben a gyógyszeres terápia kudarca esetén, valamint diszplázia vagy karcinóma kialakulásakor a műtéti megoldás mellett kell döntenie (71).

I.3.2. A gyulladásos bélbetegségek patogenezise

I.3.2.1. Genetikai és környezeti tényezők

Az IBD kialakulása multifaktoriális; genetikai hajlam, környezeti hatások, az immunszabályozás hibái és nyálkahártya-eltérések együttesen vezethetnek a betegség megjelenéséhez. Az IBD kialakulásával kapcsolatban családi halmozódás figyelhető meg és ikervizsgálatok eredményei is alátámasztják a genetikai meghatározottságot. A teljes genomot felölelő kapcsoltsági vizsgálatok eddig 9 (IBD1-9) lókuszt azonosítottak a genomban, melyek hajlamosítanak az IBD kialakulására. Az első CD-re hajlamosító genetikai eltérést a 16-os kromoszómán elhelyezkedő CARD15/NOD2 génben fedezték fel (72). A NOD2 fehérje a veleszületett immunrendszer részeként képes felismerni a Gram pozitív és negatív baktériumokban is megtalálható muramyl dipeptid peptidoglikánt és ezáltal aktiválni az immunrendszert (73). Az IBD 3 lókuszt a 6-os kromoszómán elhelyezkedő humán leukocita antigéneket (HLA) tartalmazza. Az immunrendszer részben a HLA vagy fő hisztokompatibilitási rendszer (MHC) által kódolt egyedi sejtfelszíni fehérjék alapján képes felismerni a saját és idegen struktúrákat. A HLA antigének változékonysága ellenére úgy tűnik, hogy a HLA-DRB3*0301, HLA-DRB1*0103 és DRB1*1502 allélok hajlamosítanak az IBD kialakulására (74). Haplotípus vizsgálatok alapján a 10-es kromoszómán elhelyezkedő DLG5 is összefüggésbe hozható az IBD megjelenésével. A DLG5 fehérje a sejt-sejt kapcsolatban játszik szerepet, ezáltal a barrier funkció szabályozásában vehet részt (72). Más genetikai vizsgálatok a tumor nekrosis faktor (TNF), a citokinek közül az IL23R, a multi-drog transzporter fehérje (MDR-1) és egyes organikus kation transzporterek (SLC22A4, SLC22A5) génekben azonosítottak IBD-re jellemző polimorfizmusokat (74–76).

Az eddig azonosított genetikai eltérések közül azonban egyiknek sem teljes a betegséget okozó penetranciája. Az elmúlt évtizedekben az IBD incidenciája fokozatosan növekedett, melynek hátterében egyes szerzők a higiénias környezet változását feltételezik. A javuló egészségügyi és higiéniai viszonyok következtében kora gyermekkorban a szervezet nem találkozik patogén organizmusokkal, melynek következtében a későbbi életkorban enterálisan bekerülő ismeretlen antigénekre inadekvát immunválasz jelentkezik (77). A dohányzás érdekes módon az UC kialakulásával szemben védő hatással rendelkezik, azonban a CD kialakulására hajlamosít (78). A fogamzásgátlók, nem szteroid gyulladásgátlók, antibiotikumok használata szintén növelhetik az IBD kialakulásának esélyét (77).

1.3.2.2. Megváltozott immunológiai és barrier funkció

Számos kutatás megerősítette az immunrendszer fokozott aktivitását és a veleszületett, valamint az adaptív immunválasz megváltozott működését IBD-ben (76,79,80). A veleszületett immunitás nem specifikus védelmet biztosít a kórokozók ellen. A makrofágok, dendritikus, valamint epithel sejtek úgynevezett mintázat felismerő receptorok (PRR) segítségével azonosítják a patogén asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) és az NF- κ B útvonal következményes aktivációján keresztül segítik elő a gyulladás kialakulását. A PRR aktiváció ezen kívül fokozza az antigén-prezentáló sejtek érését és a T-sejt aktivációt, ezáltal kommunikációt is biztosít a veleszületett és az adaptív immunrendszer között (76,80). Az adaptív immunrendszer működése antigén specifikus és hosszú távú immunitást biztosít. Az adaptív immunválasz kialakításában elsősorban az immunglobulin termelő B-sejtek és a gyulladásos mediátorok szabályozásában kulcsszerepet betöltő Th1 és Th2 sejtek vesznek részt. Az CD-re inkább a Th1 sejtek, míg UC-re a Th2 által termelt citokinek túlsúlya jellemző (79). Az előbbieken kívül más T-limfocita alcsoportok megváltozott működését is leírták IBD-ben. Szöveti biopsziás mintákban a döntően proinflammatorikus hatású Th17 sejtek fokozott aktivitását találták, míg a T-sejt differenciálódást és aktivitást szabályozó Treg sejtek gyulladásgátló hatása ineffektív volt (80). A szervezet a bélcsatornában számos idegen antigénnel találkozik és az immunszabályozás hibái kontrollálatlan gyulladás kialakulásához vezethetnek. Egyes

feltételezések szerint patogén mikroorganizmusok (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*) váltják ki a gyulladást, egyértelmű összefüggést azonban még egyik kórokozóval sem sikerült kimutatni. Más elméletek a bélflóra védő és károsító baktériumainak egyensúlyának felbomlását hangsúlyozzák IBD-ben (77). Egyes *Bacteroides* és *Enterobacteriaceae* fajok általában nagyobb, míg *Firmicutes* és *Faecalibacterium prausnitzii* baktériumok alacsonyabb számban fordultak elő Crohn betegek bélcsatornájában, mint egészségesekben. A diszbiózis és a CD közötti kapcsolat ellenére azonban nem sikerült egyetlen olyan fajt sem azonosítani, mely kétséget kizáróan felelős lenne a betegség megjelenéséért (81).

Régóta ismert, hogy a bél permeabilitása fokozott IBD-ben. Sokáig nem volt egyértelmű, hogy a megváltozott permeabilitás oka vagy következménye-e a gyulladásos folyamatoknak. Az elmúlt években állatkísérletek, valamint teljes genom génexpressziós vizsgálatok alapján került előtérbe a nyálkahártya megváltozott barrierfunkciójának jelentősége az IBD kialakulásában (82,83). A bélnyálkahártya nem csupán fizikai védővonalat hoz létre, hanem a bakteriális, vírus és gombás antigének PRR-okon keresztül történő felismerésével az immunválasz kialakulásában is kiemelt szerepet játszik (76). A bélhámsejteknek egyszerre kell biztosítaniuk a megfelelő víz- és ioncserét, a tápanyagok felszívódását, ugyanakkor egyensúlyt kell fenntartaniuk a bélbe jutó ártalmatlan antigének, a kórokozók és a normál bélflóra közötti immunológiai folyamatok szabályozásában (83). A védvonal kialakításában több komponens is szerepet játszik. A mikrobák elleni védekezéshez hozzájárul a goblet sejtek által szekretált és az epithél sejtek apikális feléhez kötött glikoproteinek (mucin) által kialakított nyálkaréteg. Ez átengedi a különböző tápanyagokat, ugyanakkor elhatárolja a baktériumokat a bélhámsejtektől. A védekezésben és a sejt regenerációban hasonlóan fontosak a szekretált antimikrobiális peptidek és IgA molekulák. Végül az epithel sejtek határolják el szorosan a bélment a mélyebb kötőszövetes rétegektől. Ebben kiemelt szerepet játszanak a sejtek közötti adhézis kapcsolatok és a tight junction (TJ) fehérjék (72,80,83). Az elégtelen barrier funkció következtében mikrobiális és más idegen antigének juthatnak a mélyebb rétegekbe és a T-sejtek aktivációján keresztül gyulladást indukálhatnak.

I.3.3. A glükokortikoidok gyulladásgátló hatása és a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásának mechanizmusai IBD-ben

A glükokortikoidok erős gyulladásgátló hatását gyakran használják az IBD és más krónikus gyulladásos megbetegedések kezelésében. A glükokortikoidok többek között gátolják a T-sejt aktivációt és a proinflammatorikus citokinek transzkripcióját. Immunszuppresszív hatásuk hátterében több molekuláris mechanizmus is ismert. Ezek közül a legjobban tanulmányozott az NF- κ B proinflammatorikus jelátviteli útvonalra kifejtett gátló hatás. Az NF- κ B számos citokin, kemokin, komplement faktor transzkripciójának aktiválásán, valamint a ciklooxygenáz-2 indukció következtében fokozott prosztaglandin termelésen keresztül kulcsszerepet játszik a gyulladás kialakulásában és fenntartásában (84). A glükokortikoidok gátolják az NF- κ B transzkripció hatását, valamint az I κ B serkentésén keresztül inaktív állapotban tartják a NF- κ B komplexet a citoplazmában (84,85). Bakteriális, virális ingerek, citokinek, valamint UV fény okozta károsodás hatására a MAPK kaszkádon keresztül aktiválódik a c-Jun transzkripció faktor, majd az így keletkező c-Jun:cFos heterodimerek aktiválják a számos gyulladásos mediátor promoterében megtalálható AP1 kötőhelyeket (32,84,86). A glükokortikoidok a MAPK foszfatáz 1 indukcióján keresztül inaktiválják a MAPK foszforilációs kaszkád tagjait, ezáltal meggátolják az AP1-en keresztül történő gyulladásos aktivációt. Ezen kívül a glükokortikoidok protein-protein interakción keresztül is képesek gátolni az AP1 funkciót (32). Egyes elméletek szerint, mivel az NF- κ B, AP1 és GR jelátviteli utak azonos transzkripció koaktivátor fehérjéket képesek felhasználni, ezért lehetséges az, hogy a glükokortikoidok a koaktivátorok kompetitív gátlásán keresztül is kifejtik hatásukat (29). Egyes gyulladásos mediátorok képesek stabilizálni a tumor nekrosis faktor α (TNF α) hírvivő RNS-t (mRNS), amely egyébként gyorsan lebontódna a citoplazmában. A GR aktiváció képes megfordítani ezt a folyamatot, aminek hatására a ribonukleázok újra képesek degradálni az mRNS-t (87).

Az elmúlt években számos kísérlet felvetette, hogy IBD-ben az elégtelen barrierfunkció is hozzájárulhat a gyulladás kialakulásához. *In vitro* kísérletek alapján a szteroidok antagonizálják a TNF α barrier permeabilitást növelő hatását, ráadásul a TJ fehérjék szabályozásán keresztül csökkentik a paracelluláris transzportfolyamatokat (88,89). Mindezek alapján a glükokortikoidok nem csupán a gyulladást magát, hanem elképzelhető, hogy a gyulladást kiváltó folyamatokat is képesek befolyásolni IBD-ben.

Sajnálatos módon az IBD-ben szenvedő betegek egy részében a glükokortikoidok hatástalannak bizonyulnak. Eddigi tanulmányok alapján kiemelt fontosságú lehet ezekben az esetekben, hogy a szteroidok nem képesek elnyomni a T-limfociták és más gyulladásos sejtek túlműködését (85). A rezisztencia kialakulásának hátterében számos molekuláris folyamat állhat. Ezek érinthetik a GR-t és a hozzá kapcsolódó kofaktorokat, a proinflammatorikus mediátorok működését, és a xenobiotikumok eltávolításáért felelős multi-drog rezisztencia 1 (MDR1 vagy P-glikoprotein) fehérjét is (90). Az esetek egy részében az inszenzitivitás mögött genetikai tényezők figyelhetők meg. A leggyakrabban tanulmányozott *GR* egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) közül az ER22/23EK, TthIII és a GR-9 β csökkent, míg az N363S és a BclI fokozott glükokortikoid-érzékenységgel járnak. Ezek közül IBD-ben azonban eddig csak a BclI esetében sikerült összefüggést találni a glükokortikoid-reszponzivitással (90). Ezen kívül a GR kofaktor *FKBP1*, a *MDR1*, a gyulladásos mediátor *NALP1* és a *TNF α* génekben sikerült olyan SNP-ket azonosítani, melyek hozzájárulhatnak a szteroid-rezisztencia kialakulásához (90–92). A megváltozott lokális glükokortikoid-egyensúly is hozzájárulhat a szteroid-rezisztencia kialakulásához (59). A 11 β -hydroxiszteroid-dehidrogenáz enzimek (HSD11B) szövetspecifikus módon a kortizon-kortizol átalakulásban vesznek részt. A HSD11B1 az aktív kortizol, míg a HSD11B2 az inaktív kortizon konverziójáért felelős. A lokálisan megváltozott HSD11B aktivitás pre-receptor szinten képes befolyásolni a szteroidok elérhetőségét, ezáltal glükokortikoid-rezisztens környezetet létrehozva (59). A szöveti GR α receptor mennyisége is jól korrelált UC betegekben a glükokortikoid terápia eredményességével (93). Több tanulmány az elégtelen glükokortikoid hatás hátterében a GR β megnövekedett expresszióját mutatta ki a keringő PMBC-ekben, illetve szöveti szinten is (64,65,87,93).

Szteroid-inszenzitivitást okozhat a proinflammatorikus mediátorok túlzottan magas szintje is. Számos *in vitro* tanulmány támasztja alá, hogy az emelkedett IL-1, IL-2, IL4, TNF α és AP1 szintek képesek meggátolni a normális GR α funkciót (90). A MDR1 protein fontos szerepet játszik a gyógyszerek sejtekből történő aktív kiválasztásában. Glükokortikoidok iránt rezisztens betegek keringő limfocitaiban fokozott *MDR1* expresszió mutatható ki, ráadásul az MDR1 protein gátlása csökkenti a kortizol sejtekből történő kipumpálását a T-limfocitákban és epithel sejtekben (87,90).

I.4. A glükokortikoidok szerepe a cirkadián óra szabályozásában

I.4.1. A cirkadián óra

Már a XVIII. században megfigyelték, hogy a nappalok és éjszakák váltakozása során egyes növények aktivitása periodikus mintázatot mutat. A cirkadián ritmus szabályozó rendszerének felderítésére az 1950-es évektől kezdve számos állatkísérletet végeztek, majd az 1971-ben ecetmuslicákban (*Drosophila melanogaster*) sikerült feltárni az első cirkadián óra szabályozásában részt vevő géneket is (94,95). A cirkadián óra a legtöbb fényérzékeny organizmusban, így a cianobaktériumoktól az emberig megtalálható és segít alkalmazkodni a környezet ritmikus változásaihoz (96).

Emlősökben a cirkadián óra szerkezetileg két alegységre, központi és perifériás cirkadián órára osztható. A központi cirkadián óra a hipotalamusz szuprakiazmatikus magjában (SCN) helyezkedik el. Az SCN-be érkező számos idegpálya közül emlősökben az egyik legfontosabb a retina ganglionsejtjeiből induló tractus retinohypothalamicus, mely a fény-sötétség váltakozásáról szolgáltat információt. Más idegpályákon keresztül táplálkozási, hőmérsékleti ingerek, sőt direkt vagy indirekt módon egyes szteroid hormonok is képesek módosítani az SCN működését (96–98). Fény hatására az SCN sejtjeiben egységes, szinkronizált válasz jön létre, így a külső információ továbbításával az SCN-ből kiinduló idegpályákon keresztül, illetve neuroendokrin mediátorok (GABA, AVP, VIP, PK2) elválasztásával más agyterületek és a belső szervek cirkadián működését szabályozza (96). Az SCN további fontos szerepe, hogy a tobozmirigyhez futó idegpályákon keresztül az „alváshormonnak” is nevezett melatonin elválasztást is szabályozza (96). Összefoglalva tehát a központi cirkadián óra a külső és belső információk integrációjával szinkronizálja és vezérli az egész szervezet napi ritmusát.

A perifériás cirkadián óra a legtöbb szervünkben megtalálható, az SCN-től függetlenül is önálló működésre képes rendszer, amely számos, szövetspecifikus folyamat ritmikus szabályozását végzi (96,99,100). Érdekes módon az egyes szervekből kivett szövettenyészetekben is megfigyelhető néhány napig a cirkadián óra gének expressziójának egyre csökkenő amplitúdóval történő oszcillációja. Ennek magyarázata, hogy az egyes sejtekben továbbra is funkcionális marad a cirkadián óra, azonban a megfelelő szinkronizáló hatás hiányában az egyes sejtek fázisa egymáshoz képest

fokozatosan eltolódik, amelyek hatása eredményeként végül kioltják egymás hatását (101–103).

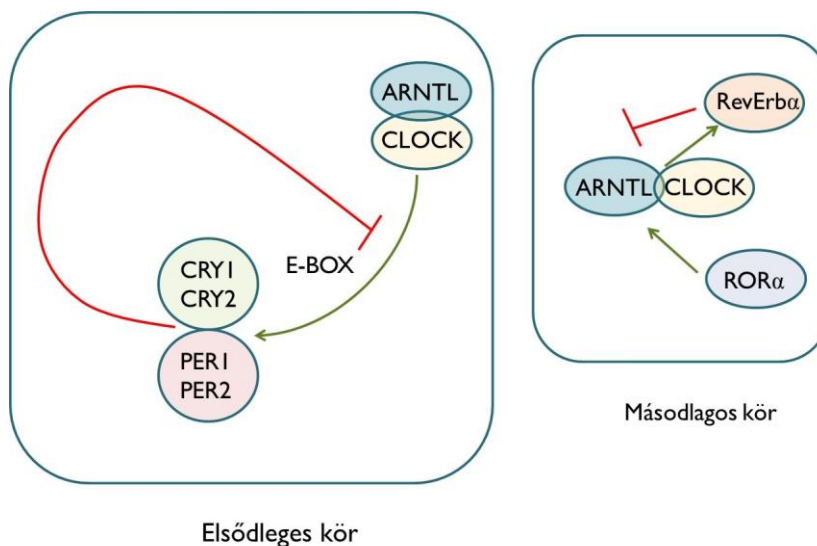
Meglepő módon még egyes daganatos sejtvonalakban is újra indukálható a cirkadián óra, ha a sejteket szinkronizáljuk a tápfolyadékban található szérum tömény alkalmazásával (szérum sokk) vagy glükokortikoidokkal történő kezeléssel (104,105).

I.4.2. A cirkadián óra molekuláris mechanizmusa

A cirkadián óra molekuláris szerkezetének magját az úgynevezett óragének, két egymáshoz kapcsolódó és kölcsönhatásban álló szabályozó köre alkotja. Az elsődleges visszacsatoló körben a Period-Arnt-Single (PAS) transzkripciós családba tartozó ARNTL (BMAL1) és CLOCK fehérjék egymással heterodimert alkotva serkentik az ún. E-box szabályozó elemekkel rendelkező Period (*PER1*, *PER2*, *PER3*) és Cryptochrome (*CRY1*, *CRY2*) gének átíródását. Ugyanakkor a PER és CRY fehérjék a sejtmagba transzlokálódva az ARNTL:CLOCK heterodimer gátlásán keresztül megakadályozzák saját transzkripciójukat. A másodlagos szabályozó körben az ARNTL:CLOCK heterodimer serkenti a *REV-ERB α* (*NR1D1*) és *ROR α* gének átíródását. Mind a *REV-ERB α* , mind a *ROR α* képes kapcsolódni az *ARNTL* promoterében található retinsav-kapcsolt árva receptor reszponzív szekvenciákhoz (ROREs), ugyanakkor míg a *ROR α* pozitívan szabályozza az *ARNTL* transzkripcióját, addig a *REV-ERB α* gátolja azt (106).

(4. ábra)

A transzkripciós visszacsatolási folyamatok mellett számos poszt-transzlációs mechanizmus, például foszforiláció, ubikvitinálás, valamint a legújabb kutatások alapján, a rövid szabályozó RNS-ek, az ún. mikroRNS-ek is nélkülözhetetlenek a cirkadián óra szabályozásában (107,108). Mindezek együttes eredményeként a cirkadián órát alkotó gének kifejeződésének megközelítőleg 24 órás ritmikus oszcillációja jön létre.



4. ábra A cirkadián óra molekuláris szerkezete. Rövidítések: ARNTL, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like; CLOCK, circadian locomotor output cycles kaput protein; CRY1,2, cryptochrome 1,2; REV-ERB α , nukleáris receptor REV-ERB α ; ROR α , RAR-kapcsolt árva receptor A; E-box, enhancer box (109)

I.4.3. A perifériás cirkadián óra szabályozása

Az SCN az autonóm idegrendszeren keresztül, mintegy karmesterként, közvetlenül is képes befolyásolni az egyes szervekben találtató cirkadián órák működését. Központi szabályozás hiányában az egyes szövetek cirkadián órái egymáshoz képest fokozatosan eltolódnak, és a szervezet deszinkronizálódik (96,102). Állatkísérletekben a szimpatikus vagy paraszimpatikus idegrostok átvágása esetén megfigyelték többek között a tüdő-, máj- és mellékvese működés ritmusának megváltozását (110–112).

Az SCN mellett a perifériás órákat a táplálkozás, egyes hormonok és kisebb mértékben a hőmérséklet is képes szabályozni (96,100). Kimutatták, hogy az éhezés, illetve táplálkozás során felszabaduló ghrelin és leptin, egyes metabolitok (glükóz, koleszterin, zsírsavak, hem), valamint az intracelluláris energiaellátásban részt vevő nikotinsav-amid (NAD) közvetlenül is képes befolyásolni az óragének működését (96,98). Állatkísérletekben, a cirkadián lokomotoros aktivitást az SCN eltávolításával megszüntetve, az egyedek cirkadián ritmusa visszaállítható volt korlátozott etetéssel.

Számos hormon is közvetlenül szabályozhatja a cirkadián órát: a nemi hormonok közül az ösztadiol a méhben, a tesztoszteron a prosztatában szabályozza óragének transzkripcióját (113,114). A kortizol elválasztás cirkadián mintázata jól ismert, így

nem meglepő, hogy a hormonok közül a legnagyobb figyelmet a glükokortikoidok kapták. Mellékvese-eltávolításon átesett állatokban a vesében, a májban, corneában és az agyalapi mirigyben is megváltozott az óragének expressziója, ezáltal az egyes szervekben működő perifériás órák egymáshoz képest eltolódtak (115). SCN-eltávolításon átesett állatokban a glükokortikoidok ismét szinkronizálták a májban a korábban ritmikus expressziót mutató transzkriptumokat (116). Érdekes módon még fibroblaszt sejtvonalban is újra indukálható volt a cirkadián óra dexametazon hatására (105). Újabb kutatások már emberekben is kimutatták, hogy a kívülről adott glükokortikoidok képesek szabályozni a perifériás óra működését (117).

I.4.4. A cirkadián óra klinikai jelentősége

Számos tanulmány igazolta, hogy emberekben a megváltozott cirkadián ritmus (éjszakai műszak, rendszertelen táplálkozás, jet-lag) következtében fokozott a 2-es típusú cukorbetegség, az elhízás, a szív- és érrendszeri megbetegedések, valamint egyes daganatok kialakulásának kockázata (118–121). A szokásostól 12 órával eltérő alvási és étkezési mintázat már rövid távon is kimutatható élettani és metabolikus következményekkel jár. Megemelkedik az átlagos artériás középnyomás és a posztprandiális glükóz szint, valamint megfordul a kortizol-elválasztás napi ritmusa. További fontos következmény, hogy csökken a szervezetben a leptin szintje, mely az éhségérzet fokozásán keresztül elhízáshoz vezethet (122). Az alvásmegvonás következményei molekuláris szinten is kimutathatóak. A kísérletben részt vevő emberek teljes véreből izolált mintákban megváltozott a cirkadián óragének és egyes kromatin-módosulásban, gyulladásos- és immunválaszban, valamint a géntranszkripció szabályozásában szerepet játszó gének expressziója (123). Érdekesség, hogy familiáris korai alvási rendellenességben (egy autoszomális dominánsan öröklődő szindróma, amikor ez emberek már este 18 óra körül kifejezetten álmosak, ugyanakkor hajnali 4-kor már ébren vannak) sikerült azonosítani egy mutációt a *PER2* génben (124).

A cirkadián óra szövetspecifikus módon a transzkriptumok közel 10%-át képes szabályozni (125). Számos állatkísérlet történt az utóbbi években annak érdekében, hogy felderítsék a cirkadián óragének szerepét az egyes szervek szabályozásában. A **2. táblázatban**, a perifériás cirkadián órák szerepével kapcsolatos néhány példát sorolok fel, Richards és munkatársai összefoglaló cikkében pedig további részletek találhatóak a

perifériás órák élettani jelentőségével kapcsolatban (100). Állatkísérletek alapján a mellékvesekéregben található cirkadián óra fontos szerepet tölt be a glükokortikoidok diurnális ritmusának kialakításában. Per2/Cry1 knock out egerekben megszűnt a kortikoszteroidok diurnális ritmusa, és a mellékvese érzéketlenné vált az ACTH-val szemben (126). A cirkadián óra azonban a szteroidszintézis sebességének meghatározó lépését végző StAR enzim transzkripciójának szabályozásával közvetlenül is befolyásolja a kortikoszteroidok bioszintézisét (127). Cry1/2 deficiens egerekben hiperaldoszteronizmus és só-dependens módon magas vérnyomás betegség alakult ki (128). A májban az egyes óragének kiütésével csökken az inzulin-érzékenység, az epesav szintézis, valamint megváltozott a glükóz homeosztázis (129,130). A hasnyálmirigyben Arntl knock out egerekben β -sejt diszfunkció és cukorbetegség alakult ki (131).

2. táblázat A cirkadián óragének szerepe egyes szervekben. (Márta Alexa, A glukokortikoid receptor szerepe a perifériás ritmus szabályozásában, Rektori Pályamunka 2016 alapján)

Szervrendszer	Kísérletben vizsgált óragén	Tulajdonságok
Mellékvese		
	Arntl -/- egér (132)	Hipokortizolizmus Elégtelen stresszválasz
	Cry1 -/- egér (133)	Hiperaldoszteronizmus Sóbevitel-dependens magasvérnyomás
	Per2/Cry1 -/- egér (126)	ACTH-inszenzitivitás Csökkent kortizol ritmus
Hasnyálmirigy		
	Arntl -/- egér (131)	Cukorbetegség kialakulása Megszűnt glükóz stimulált inzulin szekréció
	Nr1d1 csendesítés egérben (134)	Csökkent inzulin szekréció Gátolt β -sejt proliferáció
	CRY2 polimorfizmus emberben (135)	Emelkedett éhomi vércukorszint
Gonád		
	Per1 és Per2 -/- egér (136)	Kisebb reprodukciós siker
	CLOCK mutáció férfiban (137,138)	Terméketlenség
Zsírszövet		
	PER2 és ARNTL expresszió elhízott nőkben (139)	PER2 szint fordítottan korrelál a BMI-vel ARNTL szint korrelál a zsír eloszlással, koleszterin szinttel és glükóz koncentrációval
	Nr1d1 agonistával kezelt egér (140)	Csökkent a zsírtömeg Javuló diszlipidémia Fokozott energiafelhasználás

Máj		
	Nr1d1 -/- egér (129)	Csökkent epesav szintézis és kiválasztás
	Per2 -/- egér (141)	Fokozott májgyulladás és -fibrózis
	Clock/Arntl -/- egér (130)	Csökkent inzulinérzékenység
Vese		
	Per1 -/- egér (142)	Kifejezett vérnyomásesés
	Per1 -/- egér (143)	Csökkent <i>NHE3</i> és <i>SGLT1</i> expresszió

Tüdő		
	Cry 1, Cry 2 -/- egér (144)	Acetilcolin-érzékenység és mucin szekréció ritmusa sérül
Csont és vázizomzat	Clock Δ 19 és Arntl-/- mutáns egér (145)	Csökkent izomerő Megváltozott miofilament architektúra Csökkent a sejtek mitokondrium tartalma
	Arntl -/- egér (146)	Csökkent glukóz felvétel Csökkent oxidáció
	Per1, Per2 -/- egér(147)	Fokozott csontképzés
	Arntl -/- egér (148)	Kevesebb kortikális és trabekuláris csontállomány Csökkent oszteoblaszt és oszteocita aktivitás

Fontos megemlíteni, hogy az óragének a sejtciklus szabályozásán keresztül egyes daganatok kialakulásában is szerepet játszhatnak (121,149). Állatkísérletekben irradiációt követően Per2 mutáns egerek fokozott hajlamot mutattak tumorok kialakulására. Ennek hátterében a mutáns egerekben a sejtciklus és tumorsuppresszió szabályozásában részt vevő Ciklin D1, Ciklin A, Mdm-2 és Gadd45a gének szabályozásának zavarát sikerült azonosítani (150). Mindezen kívül klinikai vizsgálatok során emlő, vastagbél, tüdő, valamint egyes vérképzőszervi daganatokban is kimutatták a Period gének megváltozott expresszióját (151).

II. Célkitűzések

A glükokortikoidok számos élettani folyamat szabályozásában vesznek részt. Jól ismert hatásait elsősorban a GR α izoformán keresztül fejtik ki, azonban a GR számos egyéb izoformája is leírásra került, melyekről jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. Munkámban egyrészt a GR β izoforma transzkripciós hatását vizsgáltam Caco-2 bélhámsejtvonalban, másrészt a GR α és GR β izoformák szerepét a cirkadián óra gének szabályozásában humán mellékvesekéreg (H295R) sejtvonalban.

1. Tanulmányozni kívántam a GR β fokozott transzkripciójának hatását a munkacsoportunk által létrehozott stabil, a GR β -túltermelő (Caco-2GR β) bélhámsejtvonalban. Arra kerestem a választ, hogy hogyan befolyásolja a fokozott GR β termelődés a géntanszkripciót, illetve milyen szerepet tölt be a glükokortikoid-rezisztencia kialakulásában.
2. Azonosítani a gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek és egészséges emberek vastagbél biopsziás mintáiból készült microarray vizsgálatok metaanalízisével az IBD-re jellemző génexpressziós eltéréseket.
3. Az IBD-re jellemző génexpressziós eltérések és a GR β túltermelés által szabályozott gének összehasonlításával, bioinformatikai módszerekkel beazonosítani a megváltozott expressziójú gének biológiai funkcióját.
4. Igazolni a perifériás cirkadián óra indukálhatóságát humán mellékvesekéreg (H295R) sejtvonalban.
5. Tanulmányozni a GR α és GR β izoformáknak a perifériás óragének szabályozásában betöltött szerepét H295R sejtvonalban.

III. Módszerek

III.1. A GR β izoforma vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben (IBD)

III.1.1 Sejtenyészetek

Caco-2 és Caco-2GR β sejteket Minimum Essential Médiumban tartottam fenn, melyet 10% főtális borjú szérummal (FBS), 1mM nátrium-piruváttal, 0,1mM nem-esszenciális aminosavakkal és 1% penicillin/sztreptomicinnel egészítettem ki. A sejtek fenntartása párásított inkubátorban, 5% CO₂ mellett történt 37C^o-on. Minden összetevőt a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltunk.

III.1.2. Stabil GR β termelő Caco-2GR β sejtvonal létrehozása

A GR β klónozása a GR α izoformából történt, a közös α - β régiót célzó szenz oligonukleotid primer és a GR β szekvenciájára specifikus antiszenz primer segítségével (Fw: ATGGACTCCAAAGAATCATTAAGTCC; Rev: TCAGATTAATGTGTGAGATGTGCTTTCTGGTTTTAACCACATAACATTTTCATGCATAGAATCCAAG). A PCR fragmentumokat pcDNA3.1 vektorokba klónoztuk. A plazmidok bázissorrendjét direkt DNS szekvenálással ellenőriztük. A Caco-2 sejteket FuGene Transzfekciós Reagens használatával GR β -t tartalmazó plazmiddal vagy üres pcDNA3.1 plazmiddal transzfektáltam a gyártó használati utasításainak megfelelően. A klonális szelekció neomycin kezeléssel történt. GR α és GR β mRNS-ek mennyiségét kvantitatív valósídejű PCR-rel határoztam meg. A GR α és GR β izoformák különálló detektálására primereket és próbákat terveztünk; GR α (Genebank azonosítószám: X03225) és GR β (Genebank azonosítószám: X03348). A GR α amplifikálása a következő primerekkel történt: GR α F, 5'-AACTGGCAGCGGTTTTATCAA- 3' és GR α R, 5'- TGGAAGCAATAGTTAAGG-AGATTTTCA-3'. A TaqMan próba szekvenciája: FAM-CCACTTCATG- CATAGAATCCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A GR β amplifikálása a következő primerekkel történt: GR β F, 5'-AACTGGCAGCGGTTTTATCAA-3' és GR β R, 5'-TGTGAGATGTGCTTTCTGGTTTTAA-3', a TaqMan próba szekvenciája: FAM-CATAACATTTTCATGCATAGAAT-

CCAAGAGTTTTGTCA-TAMRA. A primer párok jelölése FAM és TAMRA festékekkel történt (Genosys, Sigma).

III.1.3. Sejtproliferáció vizsgálata

Caco-2, üres pcDNA3.1 vektort expresszáló Caco-2 (továbbiakban Caco-2pcDNA3.1) és Caco-2GR β sejteket 96-lyukú szövettenyésztő tálcákra ültettem ki, 3×10^3 /lyuk sejtszámban. A sejtproliferációs vizsgálatot AlamarBlue Proliferation Assay-val (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) végeztem a gyártó utasításainak megfelelően, legalább hét párhuzamos biológiai mintán. A fluoreszcenciát a megadott időpontokban Varioskan Multimode Reader (ThermoFisher Scientific) készüléken mértem. A Caco-2GR β és Caco-2pcDNA3.1 klónok proliferációs képességét Caco-2 sejtekhez viszonyítva ábrázoltam.

III.1.4. Immuncitokémia

A Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 5×10^4 /lyuk sejtszámmal üveglemezekre ültettem ki. A kísérletek előtt 24 órával a médiumban használt FBS-t aktív-szén szűrt FBS-re cseréltem. A sejteket 4 órán keresztül 100nmol DEX-zal vagy vivőanyaggal kezeltem. A sejteket ezt követően 3x5 percig PBS-sel mostam, majd a fixálást és permeabilizálást -20C°-os metanollal 15 percen keresztül végeztem. PBS lemosást követően a lemezeket PBS-ben oldott 5%-os BSA-ban blokkoltam szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A mintákat GR β elleni elsődleges antitesttel (PA3-514, ThermoFisher Scientific) inkubáltam 1:500 hígításban 1 óráig 4C°-on. Ismételt PBS lemosások után a GR β és a sejtmag jelölése Alexa Fluor 488 konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:200) és 4',6-diamidino-2-phenylindollal (DAPI-val) történt 1 óráig szobahőmérsékleten, sötétkamrában. A képeket Nikon Eclipse E600 mikroszkópon Lucia Cytogenetics program segítségével készítettem. A képeket ImageJ program segítségével kvantifikáltam. A korrigált teljes sejt fluoreszcencia (CTCF) számolása legalább 25 sejtből a következő képlet használatával történt: a teljes sejtben mért pixelek értékeinek összege – a teljes sejt területe x háttér fluoreszcencia. A GR β mag/sejtplazma arányát legalább 25 sejt, sejtmagban és sejtplazmában azonos méretű területen mért fluoreszcencia intenzitás értékekből számítottam.

III.1.5 Luciferáz riporter assay

A Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 24 lyukú szövettenyésztő tálcákra 5×10^4 /lyuk sejtszámban ültettem ki antibiotikum mentes és aktív szén szűrt FBS-t tartalmazó médiumban. A Caco-2 és Caco2GR β sejteket 0,5 μ l/lyuk pGRE-SEAP riporter vektorral (Clontech, Mountain View, USA) és 0,5 μ l/lyuk pGL3 kontroll plazmával kointranszfectáltam, 1,5 μ l/lyuk FuGene6 transzfectációs reagens (Promega, Madison, USA) segítségével. A mért SEAP aktivitást a transzfectációs kontrollként használt pGL3 firefly luciferáz (Promega) értékekre normalizáltam. A méréseket Appliskan Microplate Reader készüléken végeztem, minden kísérletet legalább 3 párhuzamos mintán és a méréseket 6 alkalommal ismételtam.

III.1.6. Valós idejű PCR

Teljes RNS izolálás RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően. A reverz transzkripciót 1 μ g RNS-ből végeztem Superscript III Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies, Carlsbad, USA) használatával. A kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) méréseket előre megtervezett TaqMan Gén Expressziós Array kártya (a felhasznált primerek listája a **3. táblázatban** található) használatával ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) készüléken történt. Az eredményeket a belső kontrollként használt öt háztartási gén (glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*), 18S riboszomális RNS (*18S*), Béta-Aktin (*ACTB*), hipoxantin-foszforiboziltranszferáz 1 (*HPRT1*), transzferrin receptor (*TFRC*)) mértani átlagához normalizáltam. Néhány esetben a sejtdhézió-, sejtmigráció- és sejtprolifерáció-asszociált gének validálása egyedi TaqMan próbák (LifeTechnologies); ((osteopontin (*SPPI*) [Hs00959010_m1], chitinase-3-like-1 (*CHI3L1*) [Hs01072228_m1] és vimentin (*VIM*) [Hs00958111_m1]) segítségével. A qRT-PCR TaqMan Universal PCR Mastermix (LifeTechnologies) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően (95C° 10 perc polimeráz aktiváció, majd 40 cikluson keresztül 95C° 15 másodperc denaturáció, és 60 C° 1 perc annexáció és lánchosszabbítás) 7500 Fast Real Time PCR készüléken (Applied Biosystems) történt. Ezen esetekben a génexpressziót a belső kontrollként használt Béta-Aktin-hoz (*ACTB*)

normalizáltam. A fold change (FC) számolása a $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ módszerrel történt. Minden mérést három párhuzamos mintán végeztem el.

III.1.7. Microarray kísérletek

Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 6-lyukú szövettenyésztő tálcákra 1×10^6 /lyuk sejtszámmal ültettem ki. A kísérletek előtt 24 órán keresztül a sejteket szérummentes médiumban tartottam. A sejteket 100 nmol DEX-zal vagy vivőanyaggal 8 órát kezeltem. Teljes RNS izolálás RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével történt, az RNS integritást Agilent Bioanalyzer 2100 készüléken végeztem. A teljes genom mRNS expresszió mérése Agilent44K cDNS microarray-en történt. Teljes RNS (200ng) jelölése és amplifikációja Low Input Quick Amp Labeling Kit segítségével a gyártó utasításainak megfelelően történt. A méréseket és az eredmények értékelését Agilent DNA Microarray Scanner and Feature Extraction 9.5.3. programmal végeztem. A microarray adatok további feldolgozása Genespring GX 12.5 program segítségével gyári beállítások mellett történt. Minden kísérletet három biológiai párhuzamos mintán ismételttem.

III.1.8. Elérhető microarray alapú génexpresszió adatok meta-analízise

A Gene Expression Omnibus (GEO) és ArrayExpress online adatbázisokba feltöltött microarray gén expressziós eredményeket kerestem a következő kulcsszavakkal: inflammatory bowel disease; Crohn's disease és ulcerative colitis. Az azonos microarray platformon (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0.) készült microarray adatokat használtam fel (**4. táblázat**). A nyers adatokat együttesen, egyetlen futtatás során normalizáltam. A mintákat három csoportba soroltuk: egészséges kontroll vastagbél; Crohn betegség, colitis ulcerosa-ban szenvedő betegek. Az adatok elemzését Genespring Gx 12.5. programmal végeztem el. Összesen 245 microarray mintát vizsgáltam, amelyekből 40 egészséges kontroll vastagbél; 114 Crohn betegből származó vastagbél és 91 colitis ulcerosa betegből származó vastagbél volt.

III.1.9. Pathomechanizmus és útvonalelemzés

A Caco-2GR β sejtek és Caco-2 sejtek között, valamint a Crohn-betegség és a kontroll vastagbél minták között eltérően expresszáldó géneket, illetve a mindkét csoportban közösen eltérően expresszáldó géneket feltöltöttem az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) programba (www.ingenuity.com) (Qiagen). Ezt követően a program által javasolt beállítások mellett ún. core analízist végeztem. Statisztikai feldolgozás során csak a Benjamini-Hochberg korrigált $p < 0,05$ értéket mutató biológiai funkciókat jelenítettem meg.

III.1.10. Statisztikai módszerek

Az immuncitokémia, a proliferációs assay és a qRT-PCR eredményeinek értékeléséhez párosítatlan Student's t-tesztet használtam, SPSS Statistics 20.0 (IBM) program segítségével. A microarray adatokat Genespring GX 12.5 programmal értékeltem ki. A csoportok között eltérően expresszáldó gének azonosításához kétutas ANOVA-t követően Tukey's post hoc tesztet, illetve Benjamini-Hochberg többszörös korrekciót használtam. A fold change szűrőt minden összehasonlításban legalább kétszeres expressziós különbséget megjelenítő értékre állítottam be. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

3. táblázat A TaqMan Gén Expressziós Array kártyán felhasznált primerek listája

Gének		Háztartási gének
BCL2-Hs00608023_m1	POMC-Hs00174947_m1	18S-Hs99999901_s1
CASP1-Hs00354836_m1	PSG8-Hs01679740_mH	ACTB-Hs99999903_m1
CDH6-Hs00191832_m1	PSG9-Hs00358192_m1	GAPDH-Hs99999905_m1
COL4A6-Hs00904466_m1	PTN-Hs00383235_m1	HPRT1-Hs99999909_m1
CPE-Hs00175676_m1	RBMS3-Hs00205567_m1	TFRC-Hs99999911_m1
CRABP2-Hs00275636_m1	RHOBTB1-Hs00391761_g1	
CXCL1-Hs00236937_m1	RICH2-Hs00208256_m1	
CXCL2-Hs00601975_m1	RPL39L-Hs00364831_m1	
CXCL3-Hs00171061_m1	S100P-Hs00195584_m1	
DEFB1-Hs00174765_m1	SAMD9-Hs00539471_s1	
ECHDC2-Hs00217591_m1	SATB1-Hs00161515_m1	
FABP5-Hs02339439_g1	SLC26A9-Hs00369451_m1	
FAM65B-Hs00389971_m1	SMAD1-Hs00195432_m1	
FBXO25-Hs00362641_m1	SNX10-Hs00203362_m1	
GABRA2-Hs00168069_m1	SORL1-Hs00268342_m1	
GLIPR1-Hs01564143_m1	SPARC-Hs00277762_m1	
IL1RAP-Hs00895050_m1	SPP1-Hs00167093_m1	
LARGE-Hs00893935_m1	SSTR1-Hs00265617_s1	
NAV3-Hs00372108_m1	TGFB2-Hs00234244_m1	
NFIA-Hs00325656_m1	TMEM176A-Hs00218506_m1	
NID2-Hs01547198_g1	TMEM176B-Hs00203986_m1	
NNMT-Hs00196287_m1	TNS4-Hs00262662_m1	
PAH-Hs00609359_m1	TRPV6-Hs00367960_m1	
PDE4A-Hs01102342_mH	VIM-Hs00958112_g1	

4. táblázat A meta-analízis során felhasznált microarray alapú génexpressziós vizsgálatok listája

Szerző	Cím	GEO/ArrayExpress azonosító	PMID
Ahrens	Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis.	GSE10191	18981162
Arijs	Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment.	GSE16879	19956723
Bjerrum	Genome-wide gene expression analysis of mucosal colonic biopsies and isolated colonocytes suggests a continuous inflammatory state in the lamina propria of patients with quiescent ulcerative colitis.	GSE13367	19834973
Carey	Activation of an IL-6:STAT3-dependent transcriptome in pediatric-onset inflammatory bowel disease.	GSE9686	18069684
Csillag	Clinical phenotype and gene expression profile in patients with Crohn's disease.	E-TABM-118	16959948
Funke	Selective downregulation of retinoic acid-inducible gene I within the intestinal epithelial compartment in Crohn's disease.	E-MEXP-2083	21830273
Kugathasan	Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease.	GSE10616	18758464
Olsen	Diagnosis of ulcerative colitis before onset of inflammation by multivariate modeling of genome-wide gene expression data.	GSE9452	19177426

III.2. A GR izoformák vizsgálata a perifériás cirkadián óra szabályozásában

III.2.1. Sejtenyészet

H295R sejteket Dulbecco's modified Eagle's médium és Ham's F12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keverékében tartottam fent, melyet 15mM HEPES-sel, 6,25µg/ml inzulinnal, 6,25µg/ml transferrinnel, 6,25ng/ml szeleniummal, 1,25mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA), 5,35µg/ml linolénsavval és 2,5% Nu-szérummal egészítettem ki. A sejteket párásított inkubátorban 37°C-on és 5%-os CO₂ mellett tartottam. Minden összetevőt a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltunk.

III. 2.2. Cirkadián kísérletek

H295R sejteket 6 lyukú szövettenyésztő tálcán 10⁶/lyuk sejtszámmal ültettem ki. Szérum sokk kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően 30% Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékban inkubáltam 2 órán keresztül, majd aktív szénen átszűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékba helyeztem. A GR α kísérletekben a sejteket 24 órás szérum éheztetést követően aktív szénen átszűrt tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-zal, 1µmol RU486-tal vagy 100nmol DEX és 1µmol RU486 kombinációjával kezeltem. Néhány kísérletben a sejteket 6 lyukú szövettenyésztő tálcán 10⁶/lyuk sejtszámmal ültettem ki, majd másnap a sejteket 24 órán keresztül szérummentes vagy teljes tápban tartottam. Ezt követően a tápfolyadékot aktív szén szűrt Nu-szérumot tartalmazó tápra cseréltem, és a sejteket vivőanyaggal (0,01% etanol), metyraponnal (100µmol) vagy metyrapon (100µmol) és RU486 (1µmol) kombinációjával kezeltem. A sejteket a feltüntetett időpontokban gyűjtöttem be. Minden kísérletet három független biológiai mintán végeztem el.

III. 2.3. Valós idejű PCR

A teljes RNS-t miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A reverz transzkripciót 1µg RNS-ből végeztük Superscript VILO Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies), vagy Superscript III

Reverse Transcriptase Kit (LifeTechnologies) használatával. A qRT-PCR-t TaqMan Gén Expressziós Assay-ek (LifeTechnologies) segítségével végeztük: Period 1 (*PER1*) [Hs01092603_m1]; Period 2 (*PER2*) [Hs00256143_m1]; Cryptochrome 1 (*CRY1*) [Hs00172734_m1]; Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (*ARNTL*) [Hs00154147_m1]; *REV-ERB α* [Hs00253876_m1]; nukleáris receptor 3 C1 (*NR3C1;GR*) [Hs00353740_m1]; Proopiomelanokortin (*POMC*) [Hs00174947_m1]; kortikotropin felszabadító hormon (*CRH*) [s01921237_s1]; és Béta-Aktin (*ACTB*) [Hs99999903_m1]). A valós idejű PCR mérések 7500 Fast Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) történtek, TaqMan Universal PCR Mastermix (LifeTechnologies) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően (95C° 10 perc polimeráz aktiváció, majd 40 cikluson keresztül 95C° 15 másodperc denaturáció, és 60 C° 1 perc annexáció és láncosszabbítás). A génexpressziót a háztartási géneként használt Béta-Aktin (*ACTB*) értékekivel normalizáltam. A Fold change (FC) kiszámítása a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel történt. Minden mérést három független mintán végeztem el.

III.2.4. Tranziens transzfekció

A GR β -pcDNA3.1 plazmid (GR β) elkészítését korábban részleteztem (III.2.1. fejezet) (50). H295R sejteket 5×10^5 sejt/lyuk számmal, 24 órával a transzfekció előtt 6-lyukú szövettenyésztő tálcákra ültettem ki antibiotikum mentes tápfolyadékban. Másnap 2 órával a transzfekció előtt a sejteket Opti-MEM (LifeTechnologies) szérumentes médiumban inkubáltam majd kontrollként 2500ng üres pcDNA3.1 vektorral vagy GR β plazmiddal transzfektáltam egy éjszakán át Lipofectamine3000 reagens (LifeTechnologies) használatával. Ezt követően a tápfolyadékot aktív szén szűrt Nu-szérumot tartalmazó tápra cseréltem, majd 24 órás inkubálást követően vivőanyaggal vagy DEX-nal kezeltem 6 órán keresztül. A sejteket összességében 48 órával a transzfekció után gyűjtöttem be. Minden kísérletet 3 párhuzamos mintán végeztem.

III.2.5. Statisztikai módszerek

A statisztikai vizsgálatot SPSS Statistics 22 (IBM) programmal végeztem el. A gén-expressziót és a hormonszinteket az egyes csoportok között ANOVA-t követő Tukey's post hoc teszttel vagy Student's t-teszttel hasonlítottam össze. Az egyes csoportokban a

ritmikus génexpressziót először ANOVA-val vizsgáltam, hogy kizárjuk a véletlenszerű oszcillációt, majd ezt követően cosinor módszerrel elemeztem a ritmicitást. A cosinor analízis egy online elérhető programmal történt (<http://www.circadian.org>), mely megvizsgálta hogy a legkisebb négyzetek módszerével illeszthető-e egy cosinus görbe az adatokra, illetve hogy az illesztett görbe amplitúdója nagyobb-e nullánál (a módszert részletesebben lásd Refinetti és mtsai (152)). A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

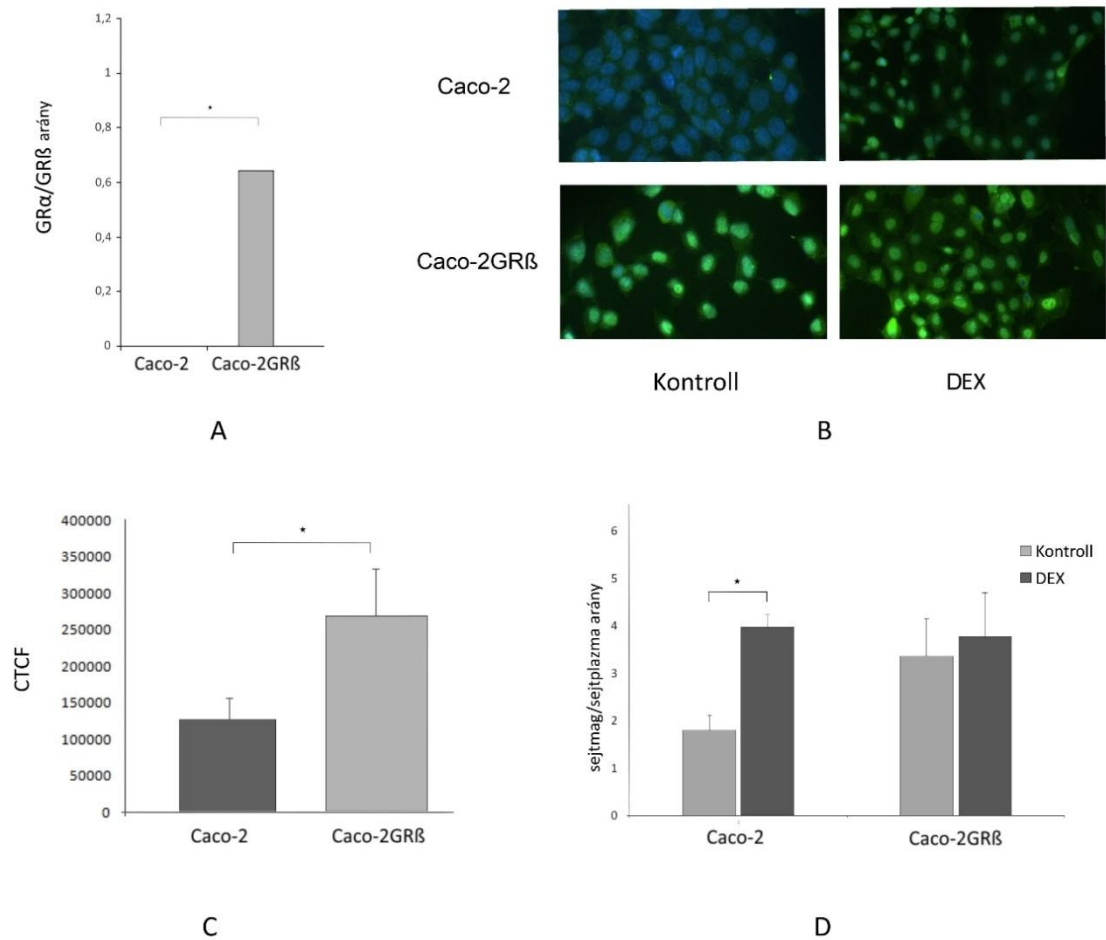
IV. Eredmények

IV.1 A GR β izoforma vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben (IBD)

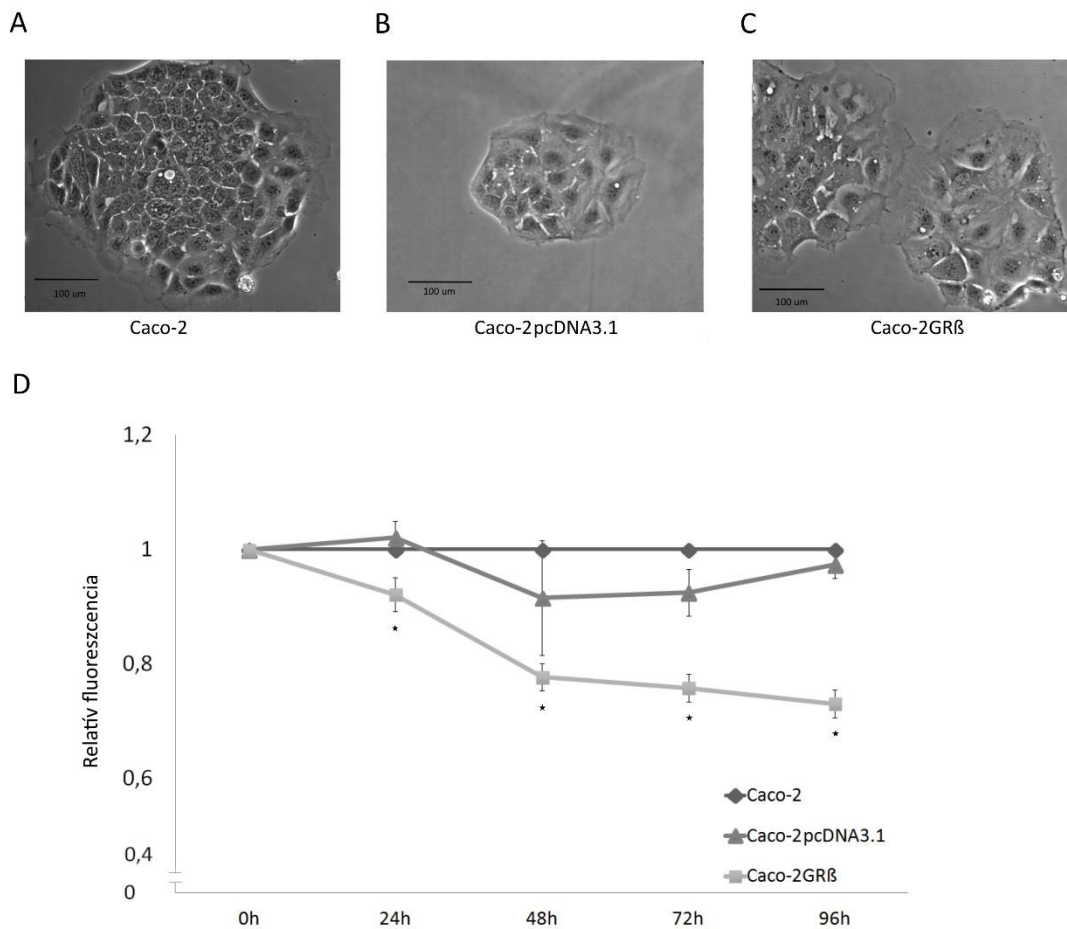
IV.1.1. A GR β izoformát stabilan túltermelő bélhám sejtvonal (Caco-2GR β) jellemzői

Caco-2 sejtekben a GR β izoforma igen kis mennyiségben expresszálódik. GR β -t termelő plazmiddal történt stabil transzfekciót követően a Caco-2GR β sejtekben a GR β mRNS szint közel százszorosára növekedett a Caco-2 sejtekhez képest (GR α/β arány 1:0,6 és 1:0,001). **(4. ábra A)** Immuncitokémiával történt festést követően a sejten belül a GR β fehérje elsősorban a sejtmagon belül helyezkedett el, de a sejtplazmában is kimutatható volt. Az mRNS szinteknek megfelelően Caco-2GR β sejtekben a GR β fehérje is intenzívebben expresszálódott Caco-2 sejtekhez képest (CTCF; átlag \pm SD 269596 \pm 64000 vs 127304 \pm 28640) **(4. ábra B és C)**. DEX kezelés hatására Caco-2 sejtekben szignifikánsan fokozódott a GR β sejtmagi elhelyezkedése (magi/plazma arány 1,79 \pm 0,33-ról 3,9 \pm 0,8 p <0,001), Caco-2GR β sejtekben a DEX kezelés bár tovább növelte a GR β sejtmagi lokalizációját, a hatás nem bizonyult szignifikánsnak (3,3 \pm 0,78-ról 3,78 \pm 0,92 p =0,07).

A GR β fokozott termelésének hatására a sejtek alakja is megváltozott. Annak érdekében, hogy kizárjuk az üres plazmid hatását Caco-2 sejteken, Caco-2GR β és üres vektorral transzfektált Caco-2 sejteket is megvizsgáltam. Mikroszkópos képeken Caco-2GR β sejtek mérete nagyobb volt, a sejtszélek egyenetlenek és szakadozottak és a plazmában több vakuólum látszódott **(5. ábra A-C)**, mint az alap sejtekben. Érdekes módon a GR β izoforma túltermelése a sejtek proliferációs képességét is megváltoztatta. Proliferációs assay-vel kimutattuk, hogy a Caco-2GR β sejtek szignifikánsan lassabban szaporodtak, mind az alap Caco-2 sejthez, mind az üres vektorral transzfektált Caco-2pcDNA3.1 sejtekhez képest **(5. ábra D)**.



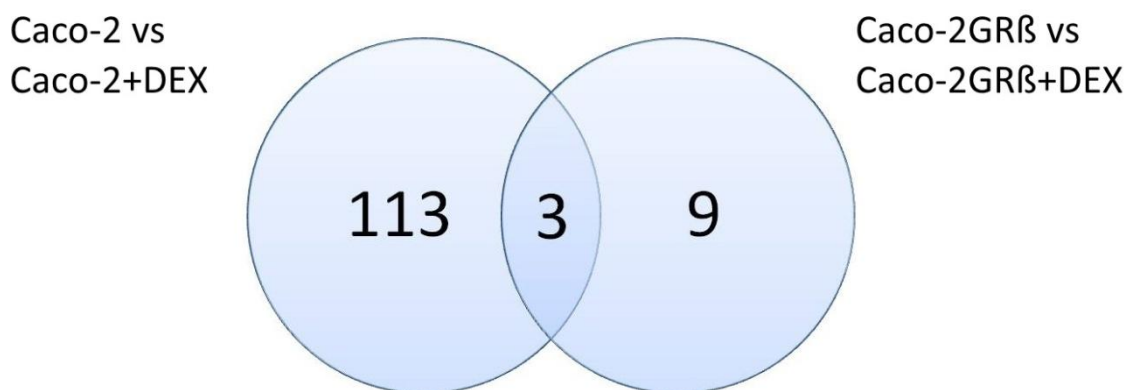
4. ábra (A) GRα/GRβ mRNS aránya Caco-2 és Caco-2GRβ sejtekben. A vizsgált géneket 18S háztartási génre normalizáltam, majd az ábrán a GRα/GRβ arányt tüntettem fel. * p<0,05 **(B)** A GRβ fehérje immuncitokémiával történő kimutatása Caco-2 és Caco-2 GRβ sejtekben. A sejteket 4 órán keresztül vivőanyaggal (Kontroll) vagy 100nmol dexamethasonnal (DEX) kezeltem. **(C)** A GRβ fehérje kvantitatív analízise. A korrigált teljes sejt fluroszcencia (CTCF) számítása legalább 25 sejtől történt. *p<0,05 **(D)** A GRβ fehérje sejtmag/sejtplazma arány kvantitatív analízise. A sejteket 4 órán keresztül vivőanyaggal (Kontroll) vagy 100nmol dexamethasonnal (DEX) kezeltem. *p<0,05



5. ábra 20X nagyítással készült mikroszkópos felvételek a **(A)** Caco-2, **(B)** az üres vektorral transzfektált Caco-2pcDNA3.1 és **(C)** GRβ overexpresszáló vektorral transzfektált Caco-2GRβ sejtvonalakról. **(D)** A Caco-2, Caco-2pcDNA3.1 és Caco-2GRβ sejtvonalak proliferációs vizsgálata. A kapott eredményeket a Caco-2 sejtvonalhoz viszonyítva ábrázoltam. Az átlag±SEM számítása legalább 7 párhuzamos mintából történt. * $p < 0,05$

IV.1.2. A GRβ izoforma vizsgálata a géntranszkripció szabályozásában

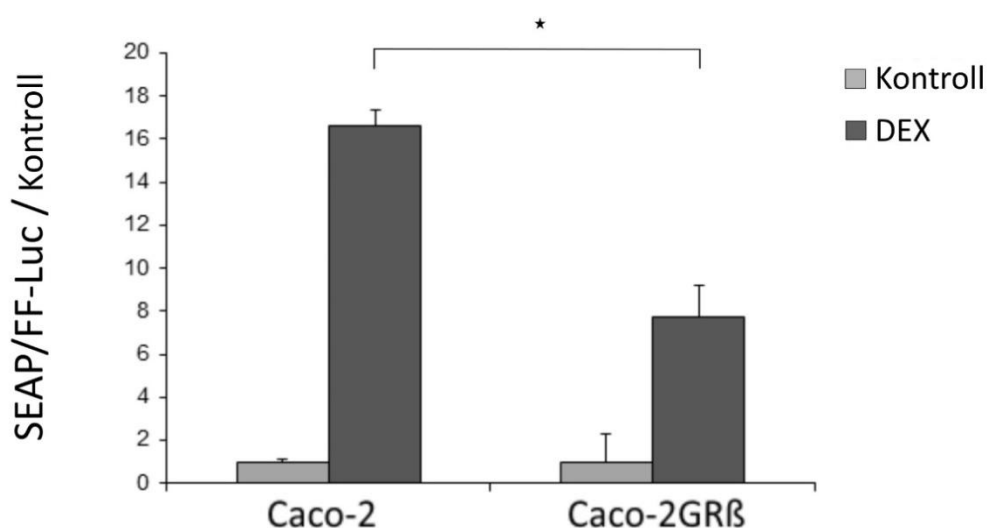
Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonalakon GRα agonista DEX kezelés előtt és után is teljes genom microarray vizsgálatot végeztünk. Caco-2 sejtekben a DEX kezelés 116 gén expresszióját változtatta meg (47 gén alul- és 69 gén felülexpresszálódott), míg Caco-2GRβ sejtekben mindössze 12 gén expressziója változott (5 gén alul- és 7 gén felülexpresszálódott) **(6. ábra)**.



6. ábra Caco-2 és Caco-2GR β sejteket 100nmol DEX-zal kezeltük, majd a szignifikáns változást mutató géneket Venn-diagramon ábrázoltam.

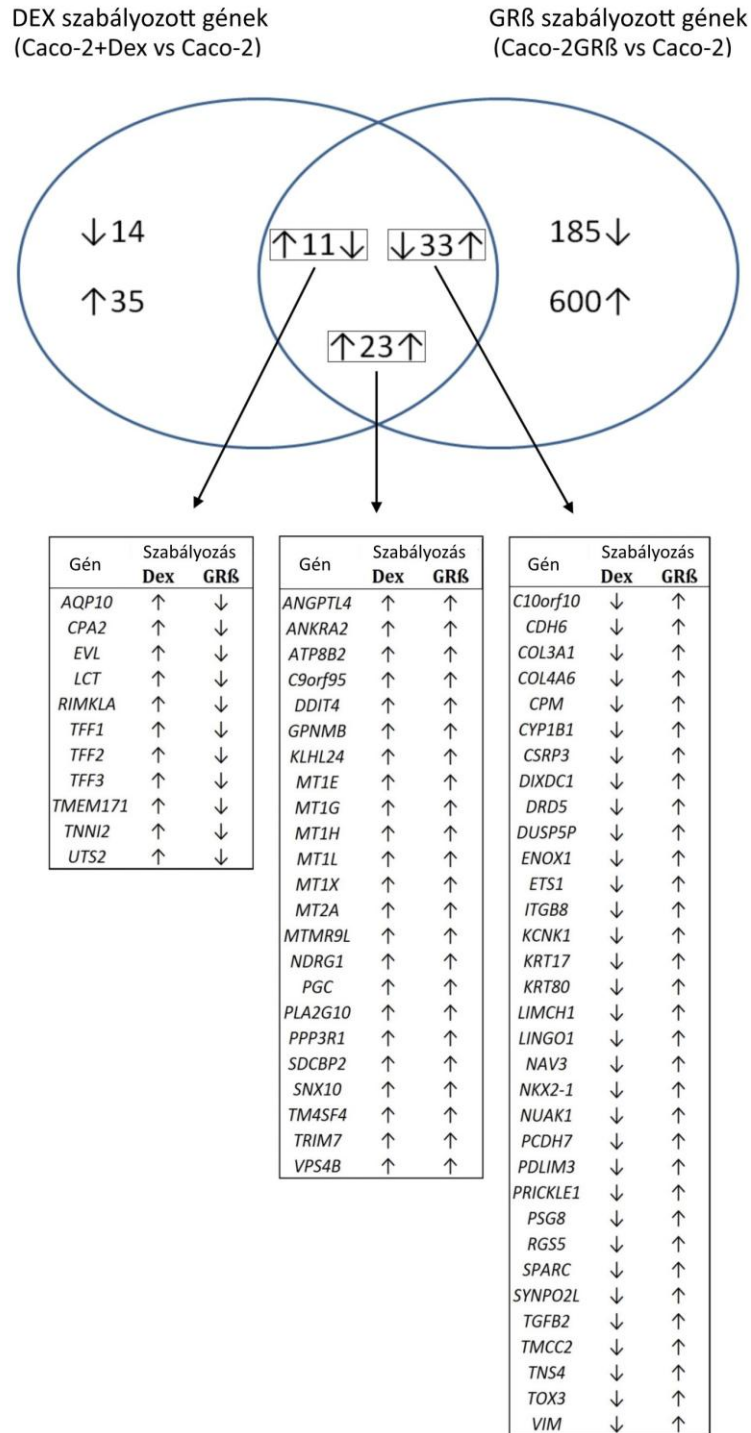
A GR β túltermelés mindezek alapján a sejtvonalat érzéketlenné változtatta a glükokortikoidokkal szemben. A GR β szteroid-érzékenységet befolyásoló hatásának további vizsgálatára a sejtvonalakat GRE–SEAP riporter vektorral transzfektáltuk, és a GR α agonista DEX kezelést követően mértem a SEAP aktivitás növekedését. A GR β izoformát fokozottan termelő sejtekben DEX hatására szignifikánsan alacsonyabb mértékben növekedett a SEAP aktivitás a kontroll csoporthoz képest (**7. ábra**). Eredményeink megerősítik, hogy a GR β izoforma fokozott termelődése csökkenti a glükokortikoidok GRE-n keresztül történő transzkripció aktivitását.

A Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalak microarray vizsgálatának eredményeit összehasonlítva a GR β túltermelés következtében 852 gén expressziója változott meg (196 alul- és 656 felülexpresszáldott). Érdekes módon a GR β overexpressziója számos olyan gén transzkripcióját is befolyásolta, amely Caco-2 sejtekben DEX kezelést követően nem változott. Mindössze 67 olyan gént azonosítottunk, amely mind a GR β túltermelés, mind a DEX kezelés hatására megváltozott; ezek közül 23 gén mindkét esetben felülexpresszáldott, míg 44 gén transzkripciója ellentétes irányban változott (**8. ábra**).



7. ábra A GRE-SEAP aktivitás vizsgálata Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonalban. A sejteket 100nmol DEX-nal kezeltem, majd a mért SEAP aktivitást a transzfekciós kontrollként használt firefly luciferáz értékekre normalizáltam. Eredményeinket a vivőanyaggal kezelt Caco-2 sejtekhez viszonyítva ábrázoltam. Az átlag±SEM számítása legalább 3 párhuzamos minta 6x ismételt méréséből történt. * $p < 0,05$

A microarray vizsgálat eredményei alapján a Caco-2 és Caco-2GRβ sejtvonal között eltérően expresszáldó gének közül többet is sikeresen validáltam TaqMan génexpressziós kártyák segítségével. A GRβ túltermelés következtében felülexpresszáldó gének között azonosítottam az apoptózis szabályozásában (*BCL2*, *CASP1*), a metabolizmusban (*CPE*, *NNMT*, *LARGE*, *PAH*, *SLC26A9*), az immun- és gyulladásos válaszban (*IL1RAP*, *SAMD9*, *DEFB1*), a szignáltranszdukcióban (*RHOBTB1*, *RICH2*, *TGFB2*), a transzkripció vagy RNS érés szabályozásában (*RBMS3*, *SATB1*) és a sejtmátrix kialakításában (*VIM*, *CDH6*, *SPP1*, *SPARC*, *COL4A6*) szerepet játszó géneket. Az alulexpresszáldó gének között az immunválaszban (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*), transzkripcióban (*NFIA*, *RPL39L*), metabolizmusban (*PDE4A*) és a jelátviteli utakban (*SAMD1*, *S100P*, *SSTR1*) szerepet játszó géneket azonosítottam. (5. táblázat)



8. ábra Venn-diagram. A fokozott GR β expresszió számos olyan gént szabályozott, mely DEX hatásra nem változott. A közösen szabályozott géneket a DEX és a GR β néhány esetben azonos irányban, míg többségében ellentétesen szabályozta.

5. táblázat Microarray vizsgálat alapján Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalak között eltérően expresszáldó gének validálása. A GR β szabályozás alatt álló és az IBD-vel kapcsolatba hozható géneket félkövér betűtípussal jelöltem. Minden esetben $p < 0,05$.

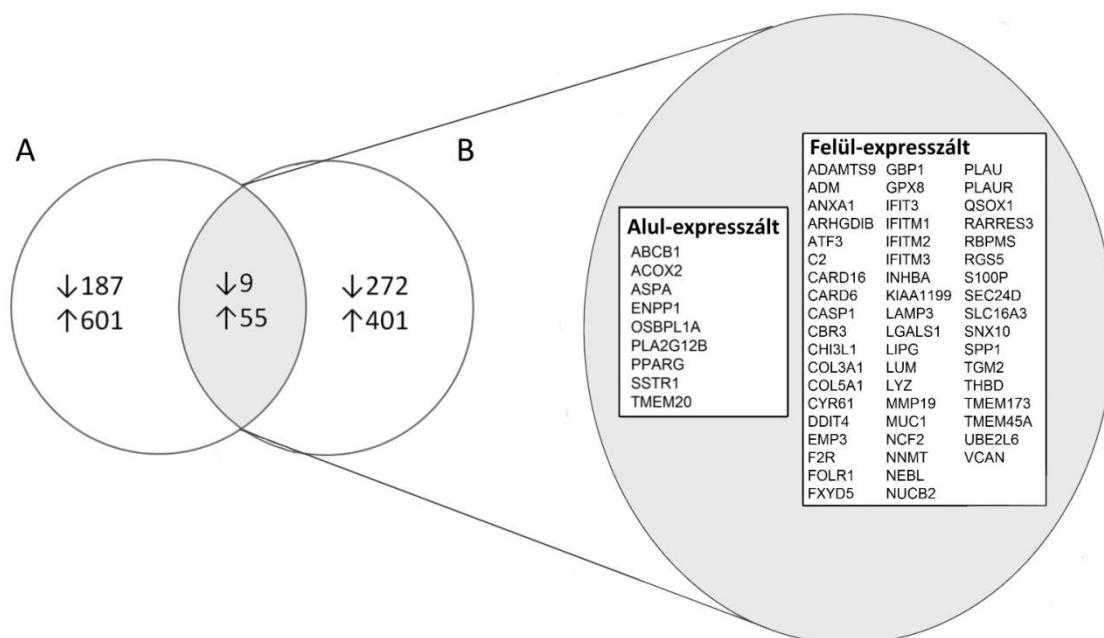
Gén szimbólum	Gén	Irány	Fold change	
			Array	qRT-PCR
Felül expresszált gének n=34				
PTN	pleiotropin	↑	133,43	118,60
GABRA2	gamma-aminovajsav (GABA) A receptor, alfa 2	↑	41,89	52,71
LARGE	like-glycosyltransferase	↑	21,50	27,67
SATB1	SATB homeobox 1	↑	33,02	27,67
RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein	↑	30,84	21,26
SPPI	szekretált foszfoprotein 1(oszteopontin)	↑	15,16	15,24
CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	↑	12,90	13,93
TRPV6	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6	↑	22,08	11,55
VIM	vimentin	↑	17,24	9,99
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	↑	25,84	9,78
NNMT	nicotinamide N-methyltransferáz	↑	33,56	7,11
FBXO25	F-box protein 25	↑	12,47	6,73
PSG9	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	↑	15,09	5,21
SLC26A9	solute carrier family 26, member 9	↑	18,81	4,63
NAV3	neuron navigator 3	↑	4,73	4,38
CASP1	kaspáz 1	↑	19,79	4,26
PSG8	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8	↑	13,38	4,23
CDH6	kadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	↑	16,79	3,89
PAH	fenilalanin-hidroxiláz	↑	18,63	3,84
FAM65B	family with sequence similarity 65, member B	↑	27,05	3,73
GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	↑	5,70	3,63
COL4A6	kollagén, IV-es típus, alfa 6	↑	3,54	3,48
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	↑	4,96	3,41
RICH2	Rho-type GTPase-activating protein RICH2	↑	20,97	3,34
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	↑	4,50	3,34
RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	↑	14,92	3,18
DEFB1	defenzin, béta 1	↑	5,50	2,57
SNX10	sorting nexin 10	↑	3,04	2,06
S100P	S100 kalcium kötő protein P	↑	3,58	2,51
CPE	karboxipeptidáz E	↑	19,19	2,00

<i>TNS4</i>	tensin 4	↑	5,00	1,88
<i>CHI3L1</i>	Chitinase-3-like2	↑	2,71	1,88
<i>SORL1</i>	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	↑	2,55	1,69
<i>SPARC</i>	secreted protein, acidic, cysteine-rich (oszteonektin)	↑	3,86	1,64
<i>IL1RAP</i>	interleukin 1 receptor accessory protein	↑	2,77	1,49
Alul expresszált gének n=14				
<i>TMEM176A</i>	transzmembrán protein 176A	↓	28,72	26615,89
<i>RPL39L</i>	ribosomal protein L39-like	↓	16,63	652,58
<i>TMEM176B</i>	transzmembrán protein 176B	↓	26,17	501,46
<i>ECHDC2</i>	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2	↓	17,43	238,86
<i>NID2</i>	nidogen 2 (osteonidogen)	↓	26,74	30,91
<i>POMC</i>	proopiomelanokortin	↓	5,26	26,17
<i>PDE4A</i>	foszfodiészteráz 4A, cAMP-specifikus	↓	10,20	20,53
<i>NFIA</i>	nukleáris faktor I/A	↓	8,22	9,32
<i>CXCL1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	↓	8,84	8,28
<i>SSTR1</i>	szomatosztatin receptor 1	↓	5,15	6,63
<i>SMAD1</i>	SMAD family member 1	↓	4,59	6,15
<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	↓	10,28	1,65
<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	↓	2,56	1,40
<i>CXCL3</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	↓	3,09	1,32

IV.1.3. Az IBD-ben eltérően expresszáldó és a GR β által szabályozott gének azonosítása és funkcionális vizsgálata

Az IBD-ben eltérően expresszáldó gének meta-analízise során 8 különböző tanulmány összesen 245 microarray vizsgálatának adatait elemeztem. A kiválasztott tanulmányokban a teljes genom microarray vizsgálatokat IBD-ben (Crohn betegségben vagy colitis ulcerosában) szenvedő betegek és egészséges emberek vastagbél nyálkahártyából vett biopsziás mintáiból végezték. Vizsgálatom során a Crohn betegek és egészségesek mintáinak összehasonlítása után 737, míg colitis ulcerosa és az egészségesek között 838 eltérően expresszáldó gént találtam. Ezt követően az egészségesek és a Crohn betegek között, valamint a Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalak között eltérően expresszáldó gének összehasonlításával összesen 64 azonos irányban

változó gént (55 felülexpresszáldó és 9 alulexpresszáldó) sikerült azonosítanom (**9. ábra**). Érdekes módon további 28 olyan gént is találtam, amely az összehasonlításban ellentétes irányban változott. Ugyanezt az összehasonlítást colitis ulcerosában szenvedő betegek microarray adataival is elvégeztem, de a közösen változó géneket tekintve nem találtam érdemi eltérést a Crohn betegekben talált eltérésekhez képest.

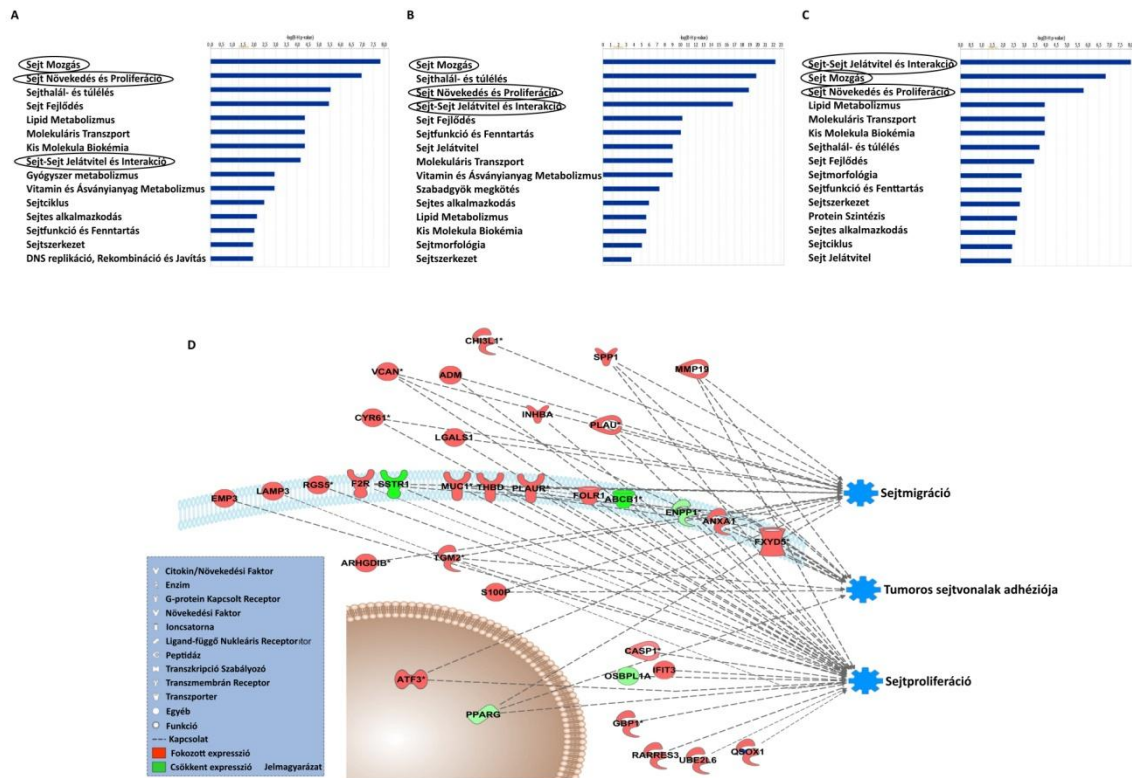


9. ábra A Caco-2GR β sejtekben a Caco-2 sejtekhez képest (A) és a Crohn betegségben az egészséges bélszövethez képest (B) eltérően expresszáldó géneket Venn diagramon ábrázoltam. Az átfedést mutató gének listáját kinagyítva ábrázoltam.

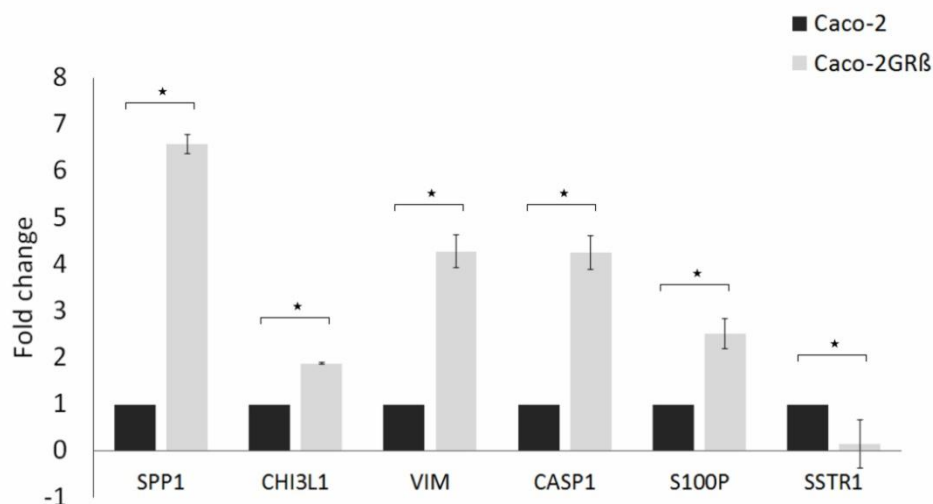
A Caco2-GR β sejtekben és Crohn betegségben közösen változó gének funkcionális analízise alapján a „sejt-sejt jelátvitel és interakció”, a „sejtmozgás” valamint a „sejt növekedés és proliferáció” kategóriákon belül elsősorban a tumorsejtek adhéziója, a sejtmigráció és a sejtproliferáció folyamatai érintettek (**10. ábra**).

A GR β által szabályozott sejtheadhézióban, sejtmigrációban és sejtproliferációban szerepet játszó gének közül 6-ot (*SPP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1*, *S100P* és *SSTR1*) egyedi TaqMan assay-ek használatával qRT-PCR-rel validáltam. Ezek megerősítették a microarray vizsgálat során kapott eredményeket, azaz a Caco-2GR β sejtekben

szignifikánsan magasabb volt az *SPP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1* és *S100P* expressziója, míg az *SSTR1* expresszió alacsonyabb volt az alap Caco-2 sejtekhez képest (11. ábra).



10. ábra A Caco-2GRβ sejt vonalban és Crohn betegségben eltérően expresszálódó gének funkcionális vizsgálata. **(A)** Caco-2GRβ sejt vonalban a Caco-2 sejtekhez képest eltérően expresszálódó gének funkcionális kategóriái alapján. **(B)** Crohn betegségben az egészséges colon mintákhoz képest eltérően expresszálódó gének funkcionális kategóriái alapján. **(C)** GRβ overexpresszió hatására és Crohn betegségben is eltérően expresszálódó, közös gének funkcionális kategóriái alapján. Az átfedést mutató gének esetében **(C)** a top 3 funkcionális kategóriát bekarikázva jelöltem. Az A-C ábrán az első 15 szignifikáns ($p < 0,05$) funkcionális kategória került feltüntetésre. **(D)** A GRβ overexpresszió hatására és Crohn betegségben is megváltozott, közös gének analízise során a top 3 funkcionális kategóriában szereplő molekulák funkcionális annotációja.

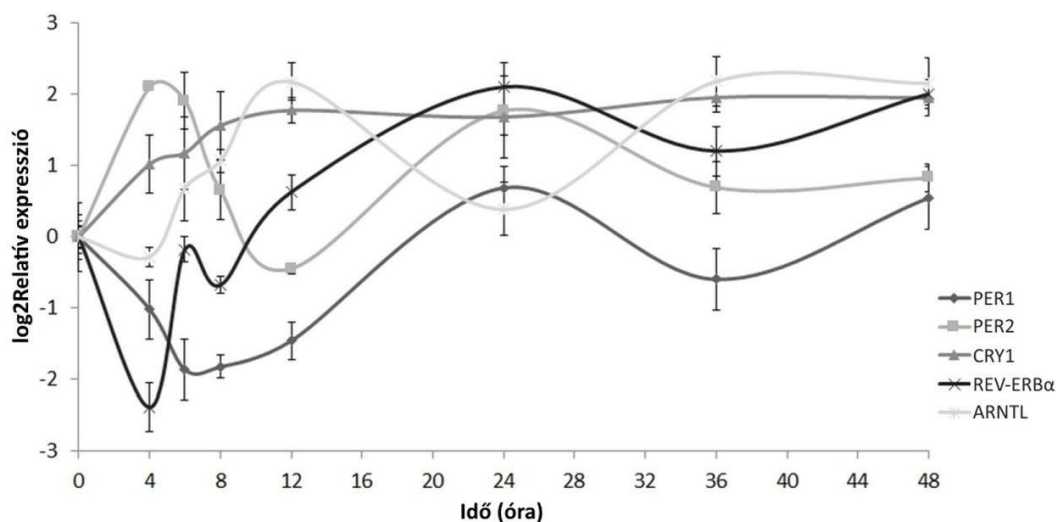


11. ábra A GRβ overexpresszió hatására megváltozott, a sejtadhézióban és sejtmigrációban szerepet játszó gének egyedi validálása qRT-PCR-rel. Caco2GRβ sejtvonalban a Caco-2 sejtekhez képest az *SSP1*, *CHI3L1*, *VIM*, *CASP1* és *S100P* szignifikánsan indukálódott, míg az *SSTR1* szignifikánsan gátlódott. Az átlag±SD számítása 3 párhuzamos biológiai mintából történt. A Fold change értékét a Caco-2 sejtekhez viszonyítva ábrázoltam. * $p < 0,05$.

IV.2. A GR izoformák vizsgálata a perifériás cirkadián óra szabályozásában

IV.2.1. A szérumsokk szinkronizáló hatásának vizsgálata H295R sejtvonalon

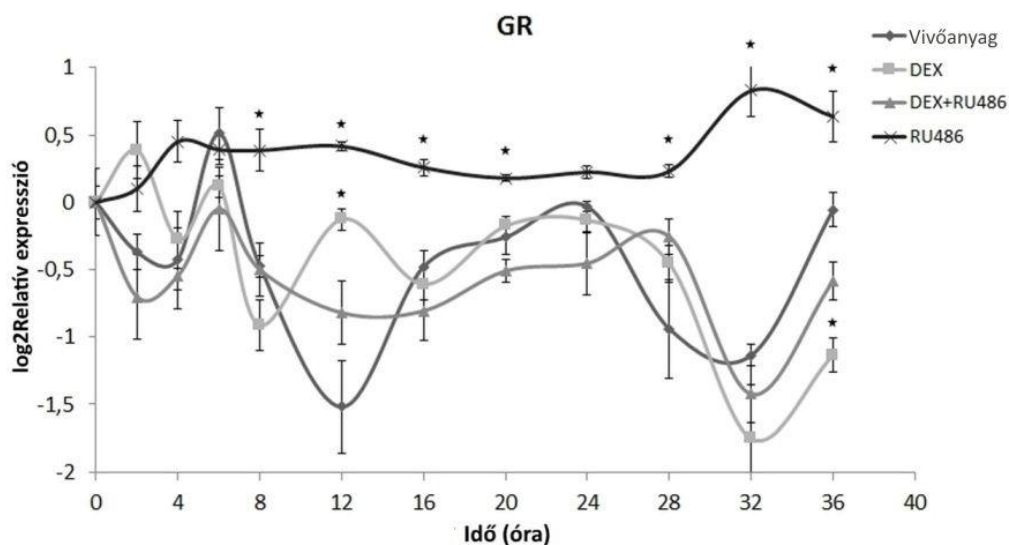
Munkámban először megvizsgáltam, hogy a H295R mellékvese sejtvonalban működőképes-e a cirkadián óra. A sejteket szérumsokk alkalmazásával szinkronizáltam, majd a cosinor analízist követően 4 óragén (*PER1*, *PER2*, *REV-ERBα* és *ARNTL*) ritmikus expresszióját sikerült igazolnom (**6. táblázat A**). A szérumsokk alkalmazását követően a *CRY1* expresszió indukálódott, azonban nem mutatott ritmikus oszcillációt (**12. ábra**). Az óragének expressziós mintázata megfelelt az irodalomban is ismert szabályozó mechanizmusoknak, azaz a *PER1* és *PER2* gének expressziós mintázata hasonló volt, míg a *REV-ERBα* és *ARNTL* gének ellentétes fázisban oszcilláltak.



12. ábra A perifériás cirkadián óra szérum sokk alkalmazásával indukálható H295R mellékvesekéreg sejtvonalban. A 0 órás időpont jelzi a szérum sokk végét. A génexpressziót a 0 órás mintához képest tüntettem fel. Az 5 vizsgált órágnál közül cosinor analízis a *PER1*, *PER2*, *REV-ERBα* és *ARNTL* gének ritmikus oszcillációját erősítette meg. Az ábrán az átlag±SEM értékeket tüntettem fel.

IV.2.2 Az óragének GRα függő transzkripció szabályozása és az elsődleges GRα célpontok azonosítása H295R sejtekben

Kísérleteim során megerősítettem, hogy a teljes *GR* expresszálódik a H295R sejtekben. Érdekes módon a teljes *GR* expresszió, a cosinor analízis alapján ritmikus mintázatot mutatott a kontroll csoportban, ami eltűnt DEX, RU486 vagy a két szer kombinált kezelése során. DEX hatására a teljes *GR* expresszió 12 óra elteltével ideiglenesen indukálódott, míg 36 óra elteltével csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ezzel ellentétben a nem specifikus GR antagonist RU486 kezelés a kontrollhoz képes fokozta a *GR* transzkripciót és megszüntette a ritmikus expressziót (**13. ábra**).

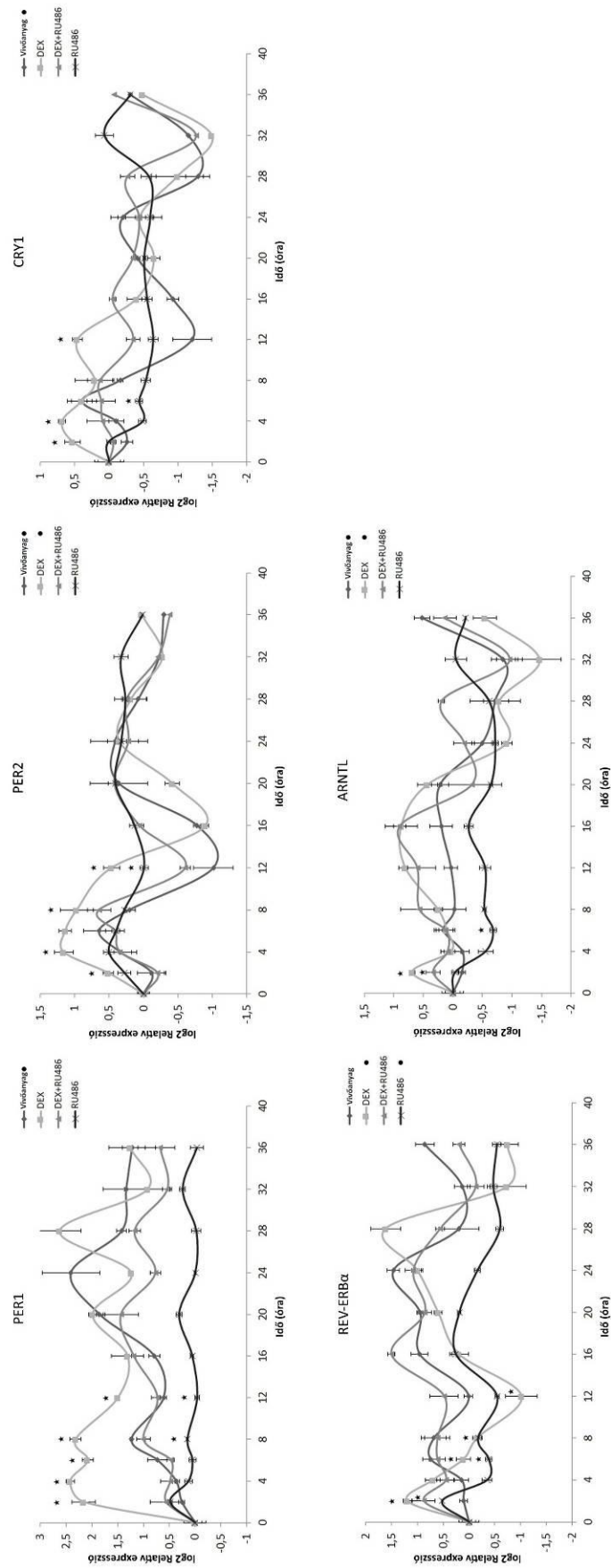


13. ábra A teljes *GR* gén expressziós változásai H295R sejtekben. H295R sejteket 24 órán keresztül szérumban éheztettem, majd aktív szén átszűrte Nu-szérumban tartalmazó tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-zal, 100nmol DEX-zal és 1µmol RU486-tal vagy 1µmol RU486-tal kezeltem. A 0 órás időpontban kezdtem meg a farmakológiai kezeléseket. A vivőanyaggal kezelt csoportban a cosinor vizsgálat ritmikus expressziót igazolt, míg a kezelések megszüntették a ritmust. A relatív expressziót a 0 órás mintához viszonyítva számítottam. A csillaggal jelölt pontokban a génexpresszió szignifikánsan különbözik az adott időpontban a vivőanyaggal kezelt csoporttól. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az ábrán az átlag \pm SEM értékeket tüntettem fel.

Ezt követően megvizsgáltam a glükokortikoidok perifériás óragének transzkripciójára gyakorolt hatását. Azoknak az óragéneknek az expressziója, amelyek a $GR\alpha$ közvetlen célpontjai, már a $GR\alpha$ aktivációt követő rövid időn belül megváltozik. Vizsgálatom során ezért a DEX, DEX+RU486 és RU486 kezeléseket követő első 12 óra transzkripció változásait elemeztem. 2 órás DEX kezelést követően az általam vizsgált összes óragén ideiglenesen indukálódott, azonban az egyidejű RU486 kezelés alapján csak a *PER1*, *PER2* és *CRY1* gének változtak $GR\alpha$ -függő módon. A *PER1* és *PER2* expresszió a DEX kezelést követő 12 órán keresztül folyamatosan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest (kivéve a *PER2* esetében 6 óránál), ugyanakkor az egyidejű RU486 kezelés kivédte a DEX hatását. A DEX kezelést követő 4 és 12 óras

időpontokban a *CRYI* expresszió magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, melyet az egyidejű RU486 kezelés kivédett. DEX kezelés gátolta a *REV-ERB α* expressziót 6 és 12 óra között, ugyanakkor ezt a hatást az egyidejű RU486 kezelés megelőzte. Az *ARNTL* expresszió nem mutatott szignifikáns változást a GR α stimulációt követő 12 órán belül **(14. ábra)**.

Vizsgálataink során *CRH* vagy *POMC* expressziót nem sikerült kimutatnom H295R sejtvonalban.



14. ábra Az óragének expressziója GR α agonista és antagonistá kezelést követően H295R sejtekben. H295R sejteket 24 órán keresztül szérumban éheztettem, majd aktív szén szűrt Nu-szérumbot tartalmazó tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol), 100nmol DEX-nal, 100nmol DEX+1 μ mol RU486-tal vagy 1 μ mol RU486-tal kezeltem. A 0 órás időpontban kezdtem el a kezeléseket. A relatív expressziót a 0 órás vivőanyag kezelt csoporthoz képest számítottam. A cosinor analízis alapján ritmikus expressziót körök jelzik. Csillaggal jelöltem a vivőanyaggal kezelt csoporthoz viszonyítva szignifikáns génexpressziós eltéréseket az első 12 órában. A $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak. Az ábrán az átlag \pm SEM értékeket tüntettem fel.

IV.2.3. Az óragének transzkripció ritmusának vizsgálata H295R sejtekben

A ritmicitás vizsgálata során a farmakológiai kezeléseket követő 4-32 óra közötti expressziós adatokat használtam, mivel az első néhány órában a génexpresszió változásai a szérum éheztes indirekt, akut következményei is lehetnek. A cosinor vizsgálat eredménye alapján a kontroll csoportban a *PER1*, *PER2*, *CRY1* és *ARNTL* gének expressziója ritmikus oszcillációt mutatott. DEX kezelés megszakította a *PER1* és *CRY1* expresszió ritmusát, ugyanakkor a kezelés hatására a *REV-ERB α* transzkripció ritmikusvá vált, valamint a *PER2* oszcilláció fázisa eltolódott. A sejteket nem specifikus GR antagonistá RU486-tal történő kezelést követően a *PER1*, *PER2*, *CRY1* és *ARNTL* gének kontroll csoportban észlelt ritmusa megszűnt, ugyanakkor érdekes módon megjelent a *REV-ERB α* ritmikus expressziója. Az egyidejű DEX és RU486 kezelés esetében egyik általunk vizsgált óragén sem mutatott ritmust. A cosinor vizsgálat eredményeit a **6. B táblázatban** részleteztem.

6. táblázat (A) Szérum sokk kezelést követően eltelt 4-48 óra expressziós adatainak cosinor elemzése. **(B)** Farmakológiai kezeléseket követően eltelt 4-32 óra expressziós adatainak cosinor elemzése

A

SZÉRUM SOKK

Gén	Robusztusság	Akrofázis (fok)	Mezor	Amplitúdó	Periódus (h)	p érték
<i>PER1</i>	96,20%	307	-0,113	1,9557	23,3	0,0028
<i>PER2</i>	93,30%	27	0,82	1,56	26,2	0,0062
<i>CRY1</i>	66,70%	229	1,72	1,0411	25,9	ns
<i>ARNTL</i>	91,30%	260	1,447	1,2537	18,9	0,0095
<i>REV-ERBα</i>	84,30%	293	1,49	1,86	23,7	0,026

B

KONTROLL

Gén	Robusztusság	Akrofázis (fok)	Mezor	Amplitúdó	Periódus (h)	p érték
<i>PER1</i>	63,90%	287	1,27	0,704	30	0,047
<i>PER2</i>	81,30%	47	-0,11	0,7016	21,6	0,046
<i>CRY1</i>	90,80%	131	-0,642	0,736	16	0,0035
<i>ARNTL</i>	68,70%	163	-0,165	0,481	30	0,03
<i>REV-ERBα</i>	47,10%	330	0,68	0,48	23	ns
GR	70,10%	100	-0,58	0,639	17	0,026

DEX

Gén	Robusztusság	Akrofázis (fok)	Mezor	Amplitúdó	Periódus (h)	p érték
<i>PER1</i>	42,00%	219	1,76	0,51	10,8	ns
<i>PER2</i>	73,10%	124	0,097	0,8627	19,3	0,038
<i>CRY1</i>	43,70%	123	-0,28	0,73	30	ns
<i>ARNTL</i>	81,90%	163	-0,03	1,04	30	0,0066
<i>REV-ERBα</i>	76,40%	353	0,266	1,0105	24,6	0,0106
<i>GR</i>	35,00%	48	-0,49	0,444	19,8	ns

DEX+RU486

Gén	Robusztusság	Akrofázis (fok)	Mezor	Amplitúdó	Periódus (h)	p érték
<i>PER1</i>	55,20%	234	0,92	0,33	30	ns
<i>PER2</i>	49,70%	259	0,088	0,308	10	ns
<i>CRY1</i>	60,00%	177	-0,38	0,392	10,7	ns
<i>ARNTL</i>	47,60%	157	0,12	0,5546	30	ns
<i>REV-ERBα</i>	58,30%	216	0,733	0,4497	30	ns
<i>GR</i>	62,70%	122	-0,66	0,397	18,1	ns

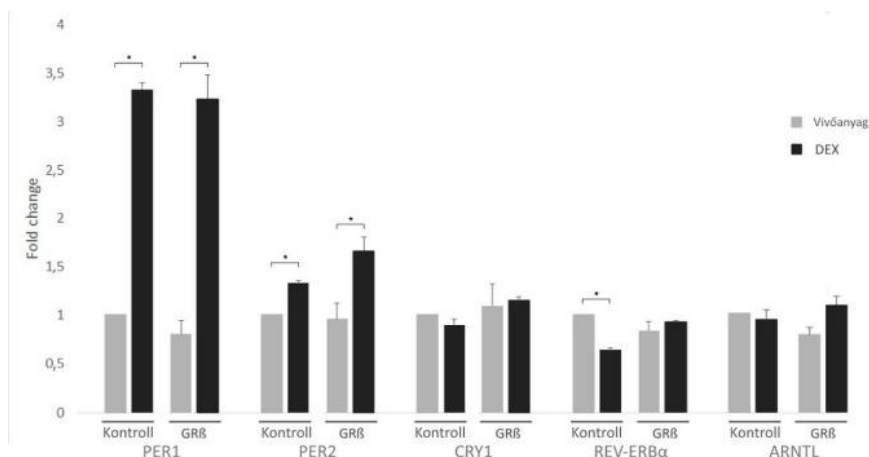
RU486

Gén	Robusztusság	Akrofázis (fok)	Mezor	Amplitúdó	Periódus (h)	p érték
<i>PER1</i>	ANOVA alapján nem szignifikáns					
<i>PER2</i>	ANOVA alapján nem szignifikáns					
<i>CRY1</i>	ANOVA alapján nem szignifikáns					
<i>ARNTL</i>	ANOVA alapján nem szignifikáns					
<i>REV-ERBα</i>	70,00%	325	-0,149	0,369	20,9	0,0271
<i>GR</i>	50,70%	132	0,333	0,195	24,3	ns

IV.2.4. A GR β túltermelés hatása az óragének transzkripciójára

Krónikusan emelkedett glükokortikoid szintek mellett gyakran fokozott a GR β expresszió, azonban nem ismert, hogy ez befolyásolja-e az óragének szabályozását. A H295R sejtekben a GR β mRNS expresszió qRT-PCR vizsgálat során a kimutathatósági határ közelében volt, de a GR β fehérje nem volt kimutatható (nincs adat feltüntetve). H295R sejteket GR β -t expresszáló vagy üres plazmiddal transzfektáltam, majd 6 órán keresztül DEX-zal vagy vivőanyaggal kezeltem. A GR β túltermelés önmagában nem befolyásolta a vizsgált óragének expresszióját. DEX hatására szignifikánsan emelkedett a *PER1* és *PER2* gének transzkripciója, míg csökkent a *REV-ERB α* gén transzkripciója

az üres vektorral transzfektált sejtekben. A GR β túltermelés kivédte a GR α aktivációt követő *REV-ERB α* szuppressziót, ugyanakkor nem befolyásolta a *PER1* és *PER2* gének GR α aktivációt követő indukcióját. (15. ábra).

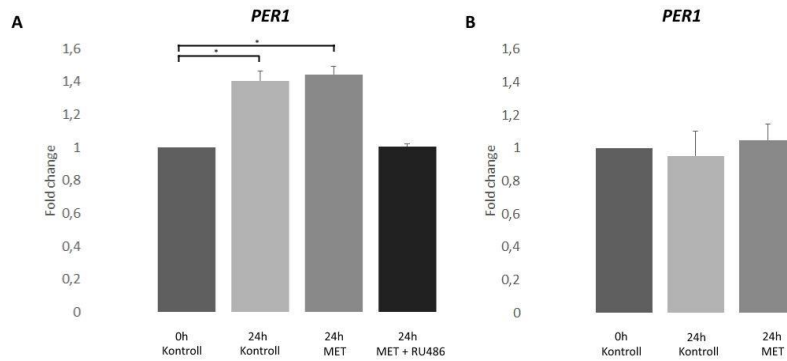


15. ábra H295R sejteket üres (kontroll) vagy GR β overexpresszáló plazmával transzfektáltam, majd 6 órán keresztül vivőanyaggal (0,01% etanol) vagy 100nmol DEX-nal kezeltem. A FC-t a vivőanyag kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva számoltam. Az ábrán az átlag \pm SEM értékeket tüntettem fel. A $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak.

IV.2.5. A H295R sejtek által termelt szteroidok nem befolyásolják a *PER1* gén indukcióját

Vizsgálataink felvetették, hogy a H295R sejtek által termelt szteroidok elegendőek lehetnek az óragének ritmikus expressziójának indukálásához. Ennek igazolására a szérum éheztetést követően 100 μ M metyrapon hozzáadásával meggátoltam a H295R sejtek endogén kortizol és tesztoszteron szintézisét. A felülúszóból folyadék kromatográfia tandem tömegspektrometriával határoztuk meg a kortizol, progeszteron és tesztoszteron koncentrációkat (153). Metyrapon kezelést követően a kortizol és tesztoszteron szint a kimutathatósági határ alá csökkent, míg a progeszteron szint érdemben nem változott. A progeszteron génexpresszió szabályozó hatása azonban valószínűtlen, mivel a kontroll és kezelt sejtek esetében is a koncentráció a kimutathatósági határon volt (nem feltüntetett adatok). A hormonszintézis gátlása ellenére a *PER1* expresszió továbbra is indukálódott, ezért a kísérleteket megismételtük és a metyrapon mellett RU486-ot is adtunk a sejtekhez, mely sikeresen kivédte a *PER1*

indukcióját. **(16. ábra A).** Ugyanakkor, ha a kísérletek előtt a sejteken nem alkalmaztunk szérum éheztetést, a *PER1* oszcilláció nem volt kimutatható. **(16. ábra B).**



16. ábra (A) H295R sejteket 24 órán keresztül szérum éheztettem, majd aktív szénen átszűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékba helyeztem és vivőanyaggal (0,01% etanol, kontroll), 100 μ mol metyraponnal (MET) vagy 100 μ mol MET-tel és 1 μ mol RU486-tal kezeltem. A 0 óra jelzi a farmakológiai kezelések kezdetét. **(B)** H295R sejteket aktív szén szűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékban tartva vivőanyaggal (0,01% etanol, kontroll), 100 μ mol metyraponnal (MET) kezeltem. A 0 óra jelzi a farmakológiai kezelések kezdetét. Az FC-t a 0 órás kontroll csoporthoz viszonyítva számítottam. Az ábrán az átlag \pm SEM értékeket tüntettem fel. A $p < 0,05$ értéket tekintettem szignifikánsnak.

V. Megbeszélés

V.1. A GR β szerepe a gén transzkripció szabályozásában

A GR β felfedezését követően sokáig úgy gondolták, hogy az izoforma kizárólag a GR α gátlásán keresztül fejtí a génexpressziót szabályozó hatását (41–43). Számos esetben összefüggést találtak a fokozott GR β expresszió és a szteroid-rezisztencia kialakulása között. Saját vizsgálatunkban is megfigyeltük, hogy a megnövekedett GR β transzkripció gátolta a GR α funkciót és a glükokortikoidokkal szemben érzéketlenné változtatta a Caco-2 bélhám sejteket. A GR α antagonistá hatás kialakulásának hátterében több mechanizmus is állhat. Ezek közé tartozik a GR α kompetitív gátlása a GRE kötőhelyeken keresztül, a funkcionálisan inaktív GR α -GR β heterodimerek képződése és a GR koaktivátorokért történő versengés (42,43,47). Ezen kívül Hela és U2OS oszteoszarkóma sejtvonalakon végzett microarray kísérletek felvetették, hogy a GR β -nak GR α független transzkripciós hatása is lehet, erre azonban jóval kevesebb bizonyíték áll rendelkezésre. A GR β nem képes glükokortikoid-kötésre és a GRE-t tartalmazó promoterek indukciójára sem. Mindazonáltal a GR β az ép DBD és AF1 doméneken keresztül feltételezhetően képes önállóan interakcióba lépni más fehérjékkel és a DNS-sel. Saját eredményeink is alátámasztják a GR β önálló transzkripciós szerepét, mivel GR β túltermelés hatására számos olyan gén expressziója változott meg, amelyek DEX kezelésre nem reagálnak. Olyan géneket is azonosítottunk, melyek mind GR β túltermelés, mind DEX kezelés hatására megváltoztak. Érdekes módon azonban, míg számos gén esetében a GR β és a DEX kezelés ellentétes módon szabályozta a transzkripciót, addig más gének esetében éppen azonos hatásuk volt. Mindezek alapján a GR β génspecifikus módon, a GR α aktivációtól eltérően szabályozza a génexpressziót. A GR β túltermelés csökkentette a glükokortikoid-érzékenységet Caco-2 sejtekben, így néhány DEX-ra is érzékeny gén esetében a GR α antagonistá hatás befolyásolhatta a transzkripciót. Az eltérően expresszálódó gének többségét azonban a GR β a GR α -tól függetlenül, önállóan szabályozta. Hasonlóan, *in vivo* állatkísérletekben a GR β túltermelés GR α -dependens és GR α -independens módon is szabályozta a génexpressziót. (154). A GR β önálló transzkripciós hatását kifejezheti a GR γ -hoz hasonló módon, képes lehet kötődni a GRE-szerű, GR β specifikus szekvenciákhoz. Ugyanakkor

a GR β AF1 doménjén keresztül protein-protein interakcióba léphet más transzkripciós faktorokkal, illetve a kromatinállomány elérhetőségét szabályozó hiszton-deacetilázokkal is (45,51).

Korábban Hela és U2OS sejtvonalakban is vizsgálták a GR β önálló transzkripciós hatását. A microarray eredmények összehasonlítása után 78 olyan gént sikerült azonosítani, melyek mindkét sejtvonalban GR β szabályozást alatt állnak, azonban ezek többsége ellentétes módon változott (45). Ezek közül saját vizsgálatunkban mindössze 6 gén változott meg GR β túltermelés hatására, mely alapján a GR β valószínűleg sejtspecifikus módon képes a transzkripció szabályozására, ami felveti a sejtspecifikus transzkripciós faktorok jelentőségét.

Immuncitokémiai módszerekkel megállapítottam, hogy Caco-2 és Caco-2GR β sejtvonalban a GR β elsősorban a sejtmagban helyezkedik el, de a citoplazmában is kimutatható volt. Érdekes módon a DEX kezelés Caco-2 sejtekben fokozta a GR β magi lokalizációját, de mivel a GR β nem képes glükokortikoid-kötésre, ezért a GR β nukleáris transzportjának mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Lewis-Tuffin és munkatársainak sikerült az RU486-ot, egy nem specifikus GR α antagonistát a GR β ligandjaként azonosítani, amely kötődést követően a GR α -tól függetlenül fokozta a GR β nukleáris transzlokációját, bár a megfigyelést egy későbbi tanulmánynak nem sikerült megerősítenie (48,49). Mivel a GR β intakt DBD-ben elhelyezkedő nukleáris lokalizációs szignállal rendelkezik, ezért elképzelhető, hogy a folyamat nukleáris transzport fehérjék közreműködésével történik. Egy korábbi tanulmányban az FKBP51 nukleáris transzport fehérje túltermelése fokozta a GR β sejtmagba történő transzlokációját (155), ami alátámaszthatja ezt a mechanizmust. Egy további lehetséges magyarázat, hogy a GR β heterodimert képezve a GR α -val együtt jut be a sejtmagba (43,46) és ott elsősorban a GRE szakaszokon keresztül fejtheti ki transzkripcióra gyakorolt hatását.

V.2. A fokozott GR β expresszió szerepe a gyulladásos bélbetegségekben

Számos autoimmun megbetegedésben fokozott GR β expressziót mutattak ki, melyet összefüggésbe hoztak a glükokortikoidok iránti rezisztencia kialakulásával. A megváltozott szöveti glükokortikoid-érzékenység számos esetben lokális gyulladás kialakulásához vezethet (59). Nem egyértelmű azonban, hogy a megnövekedett GR β expresszió oka vagy következménye lehet a helyi gyulladásos folyamatoknak. IBD-ben szenvedő betegek vastagbél biopsziás mintáiban fokozott GR β expresszió mutatható ki, melynek mennyisége korrelált a szteroid-rezisztencia kialakulásával. Nem sikerült azonban összefüggést találni a GR β jelenléte és az IBD klinikai súlyossága, aktivitása között (93,156). Szintén ismeretlen az, hogy a GR α antagonisták hatásán túl milyen hatásai lehetnek a bélnyálkahártyában kimutatott fokozott GR β expressziónak. Eddig csak néhány tanulmányban mutatták ki a GR β -t IBD-ben, mivel a jelenleg elérhető microarray platformok nem tartalmazzak GR β specifikus próbákat, így a GR β azonosítása csak egyedileg tervezett primerekkel és próbákkal lehetséges.

A bélhámsejtek fontos szerepet játszanak a bél homeosztázisának kialakításában, fenntartva egy fiziológias határt a bél lumen és a mélyebb rétegek között. A Caco-2 sejtek az enterociták számos morfológiai és biokémiai jellemzőit mutatják, így a sejtvonalat a bélhámsejtek *in vitro* modelljeként számos vizsgálatban használták az IBD molekuláris mechanizmusainak megértéséhez (157–159). A GR β túltermelés hatására megváltozott a Caco-2 sejtek morfológiája, valamint proliferációs aktivitásuk csökkent. A GR β szabályozta gének funkcionális analízise során több, a sejt növekedésben, sejt szaporodásban és sejthalálban szerepet játszó gént sikerült azonosítanunk. Ezek magyarázatul szolgálnak a csökkent proliferációs aktivitásra, valamint felvetik a GR β esetleges tumorszuppresszor szerepét is.

Vizsgálatunkban Caco-2 sejtekben a fokozott GR β termelés transzkripciós hatásait összehasonlítottam az IBD vastagbél biopsziás mintákban azonosított génexpressziós eltérésekkel. Eredményeim alapján az IBD-ben eltérően expresszáldó gének közel 10%-a GR β túltermelés hatására is megváltozott. Figyelemre méltó, hogy az IBD kialakulásával és patológiájával összefüggésbe hozott számos gén transzkripciója azonos irányban változott a fokozott GR β expresszió hatására, mint IBD-ben. Ezek elsősorban a sejtadhézióban, a sejtproliferációban és a sejtmigrációban játszanak

szerepet. Közülük több gént is sikeresen validáltam egyedi qRT-PCR és TaqMan kártyák segítségével. Érdekes, hogy Hela és U2OS sejtekben a fokozott GR β expresszió, bár eltérő aktivációs mintázattal, de a Caco-2 sejtekhez hasonlóan a sejt-adhézióban és sejt-extracelluláris mátrix (sejt-ECM) interakcióban részt vevő géneket szabályozott (45). A bélnyálkahártya megfelelő védőfunkciója és regenerációja nagymértékben függ a bélhámsejtek proliferációs képességétől, a sejt-sejt és a sejt-ECM kölcsönhatásoktól. A GR β túltermelés hatására megváltozott ECM alkotók közül, például a kollagén (*COL3A1*), galectin-1 (*LGALS*), oszteopontin (*SPP1*), oszteonektin (*SPARC*) és vimentin (*VIM*) géneknek jól ismert szerepük van a fibrózis, nyálkahártya regeneráció és bakteriális invázió folyamataiban kísérletes IBD-ben (160–163). A megváltozott sejtregeneráció, sejtadhézió és ECM összetétel összefüggésbe hozható az IBD kialakulásával, így eredményeink a GR β expresszió eddig ismeretlen szerepét vetik fel a bélhámşövetben (164). Fontos megemlíteni, hogy az összehasonlításnak korlátai is vannak, mivel a bélsövetet nemcsak bélhámsejtek, hanem immun és stromális sejtek is alkotják. Néhány az IBD-vel kapcsolatba hozott gén expressziója, (például a sejtadhéziós molekula *PECAM1*, kemokinek (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*) és az antimikrobiális védekezésben szerepet játszó *DEFB1*) GR β túltermelés hatására ellentétesen változott, mint IBD-ben. Ennek magyarázata lehet, hogy az IBD-s bélsövet mintákban több sejtípus is megtalálható, illetve az immunhisztokémiai festés során nemcsak a bélhámsejtek, hanem fibroblasztok, limfociták és mononukleáris sejtek is GR β pozitivitást mutattak (93,156). Mivel az eddigi ismeretek tükrében a GR β sejt-specifikus módon képes szabályozni a génexpressziót, ezért a különböző sejtípusokban a fokozott GR β expresszió hatásai igen összetettek lehetnek IBD-ben. A jövőben állatkísérletek segíthetnek tisztázni a bélhámşövetben fokozott GR β expresszió szerepét az IBD-ben.

V.3. Az óragének és a teljes GR ritmikus transzkripciójának vizsgálata H295R sejtekben

Munkám során megvizsgáltam, hogy a H295R sejtvonal rendelkezik-e működőképes cirkadián órával. Balsalobre és munkatársa szérum sokk alkalmazásával korábban sikeresen indukálták az óra géneket emlős fibroblaszt sejtvonalon (104). Irodalmi adatok alapján a mellékvesekéreg rendelkezik perifériás cirkadián órával (165–167), és

kísérleteink némileg meglepő módon igazolták, hogy szérum sokk alkalmazását követően a humán mellékvesekéreg karcinómából izolált H295R sejtekben is indukálható a cirkadián óra. H295R sejtekben az óragének ritmikus expressziós mintázata megfelelt a cirkadián óra működési mechanizmusának, ezáltal a sejtvonal alkalmas volt a cirkadián óra további vizsgálatára.

A mellékvesekéregben található cirkadián óra fontos szerepet játszik a glükokortikoid elválasztás napszaki ritmusának kialakításában (127). Az ACTH befolyásolhatja a mellékvesekéregben a *PER2* ritmusát, azonban hipofízis eltávolításon átesett állatokban az óragének cirkadián oszcillációja változatlan, így az ACTH egyedüli szabályozó szerepe megkérdőjelezhető (165,168). H295R sejtekben qRT-PCR mérések során nem sikerült *POMC* vagy *CRH* transzkriptumokat kimutatnunk. A glükokortikoidok számos szövettípusban képesek szinkronizálni a cirkadián órát, azonban a pontos szabályozó mechanizmus még nem teljesen ismert. Perifériás Cushing-betegségben a szteroidok szintézise a HPA tengelytől függetlenül történik és a kortizol szekréció napi ritmusa megszűnik (169,170). A központi szabályozás hiányának következtében a mellékvese daganatokban autonóm regulációs mechanizmusok léphetnek életbe (170). Korábbi vizsgálataink alapján kortizol termelő mellékvesekéreg adenómákban a GR α és GR β expresszió is emelkedett volt. (169) Asser és munkatársainak a közelmúltban sikerült igazolniuk H295R sejtekben, hogy a GR autokrin pozitív módon szabályozza a kortizol termelést. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a glükokortikoidok a H295R mellékvesekéreg sejtvonal cirkadián órájának szabályozásában is részt vehetnek. Vizsgálataim során kimutattam, hogy H295R sejtekben expresszálódik a teljes *GR*, valamint a teljes *GR* transzkripció ritmikusan változott. A *GR* szintek napszaki ritmusa más szövetekben is ismert, így a *GR* transzkripciója feltehetően cirkadián szabályozás alatt is áll (171–173). Mindezen kívül a *GR* transzkripció aktivitását is képesek befolyásolni a Cryptochrome óragének, valamint a CLOCK/ARNTL heterodimer (22,174). Más sejtvonalakkal ellentétben H295R sejtekben DEX kezelést követően nem sikerült megfigyelnünk a *GR* negatív transzkripció autoregulációját (175,176). A teljes *GR* kontroll csoportban észlelt ritmikus transzkripcióját a glükokortikoid agonista DEX, valamint a nem specifikus GR α , androgén receptor (AR) és progeszteron receptor (PR) antagonistá RU486 kezelés is megszüntette. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a farmakológiai kezelések

során megfigyelt ideiglenes *GR* expressziós változások feltehetően a cirkadián óra manipulációjának következményei. Fontos ugyanakkor megjegyeznünk, hogy a *GR* poszttranszkripcionális módon is szabályozódhat, többek között az mRNS stabilitás befolyásolásán keresztül, illetve a ubiquitin-proteaszóma útvonalon keresztül történő fehérje lebontás által (34,35,177).

Érdekes módon a szérum megvonást követően az aktív szénen átszűrt Nu-szérumot tartalmazó tápfolyadékban tartott H295R sejtekben (kontroll csoport) a *PER1*, *PER2*, *CRY1* és *ARNTL* óragének ritmikus expressziót mutattak. Az óragének ritmikus expresszióját a *GR*, androgén receptor (*AR*) és progeszteron receptor (*PR*) antagonistá RU486 meggátolta. Mivel más sejtvonalakban kimutatták, hogy a glükokortikoidok, valamint a tesztoszteron és progeszteron szabályozhatják az óragének működését (178,179), ezért felvetettük, hogy a H295R sejtek endogén szteroid termelése elegendő lehet az óragének indukciójához. Az endogén szteroid szintézis blokkolásával elvégzett kísérleteink azonban nem igazolták feltételezésünket. Eredményeim alapján az óragének oszcillációja valószínűleg a szérum éheztetés alkalmazásával lehet kapcsolatban. A szérum éheztetés, a tápanyag megvonáson keresztül megállítja sejtciklust a G0/G1 fázisban, és az elmúlt évek kutatásai alapján kölcsönhatás állhat fenn a sejtciklus és a cirkadián óra között (180). Elképzelhető továbbá az is, hogy a szérum éheztetés érzékennyé változtatta a sejteket a tápoldatban található egyes exogén faktorokkal vagy olyan endogén hormonokkal szemben (a kortizolon, a tesztoszteronon vagy progeszteronon kívül), melyek a *GR*-on, *AR*-on vagy *PR*-on keresztül hatnak. A tápfolyadék összetevői közül az inzulinról és a hemről is ismert, hogy *in vitro* vagy *in vivo* szabályozhatják az óragének transzkripcióját (181–183). A hemről kimutatták, hogy a *REV-ERB α* természetes ligandja és fokozza receptor represszor aktivitását (182). A *REV-ERB α* a saját promoterének gátlásán keresztül képes szabályozni a saját transzkripcióját (184), így mindez megmagyarázhatja *REV-ERB α* ritmikus expresszióját RU486 kezelést követően.

V.4. A *GR α* és *GR β* izoformák jelentősége az óragének transzkripciójának szabályozásában

Megvizsgáltam H295R sejtvonalban, hogy a *GR α* és *GR β* izoformák hogyan szabályozzák a perifériás óragének transzkripcióját. A H295R sejteket az erős *GR α*

agonista DEX-nal kezeltem, majd megvizsgáltam az óragének transzkripciós változásait. DEX kezelést követően gyors *PER1* indukció következett be, ugyanakkor megszűnt a *PER1* cirkadián oszcillációja. A ritmus megszűnése feltételezhetően a DEX kezelés következtében kialakult fokozott *PER1* stimuláció miatt következett be. A *PER1* szabályozása a GR α -n keresztül történt, mivel a nem specifikus GR α antagonistá RU486 sikeresen meggátolta a DEX hatását. A GR α közvetlenül szabályozza a *PER1* transzkripcióját, a promoterben azonosított funkcionális GRE-en keresztül (30,185). A *PER1* glükokortikoidokkal szembeni kifejezett érzékenysége szerepet játszhat az óragének vezérlésében. A *PER1* minimális dózisú DEX-nal történő ideiglenes indukciója vagy kísérletes túltermelése (tranzienst transzfekció által) már elegendőnek bizonyult egyes óragének expressziójának szabályozásához (30,186). Ugyanakkor az ideiglenes kis dózisú glükokortikoid kezelést követően nem alakult ki az óragének stabil, ritmikus oszcillációja (30). Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan az RU486-tal történő kezelése megszakította az óragének ritmikus expresszióját. Mindezek alapján a folyamatos GR α , AR vagy PR aktivitás elengedhetetlen lehet az óragének szinkronizált ritmusának fenntartásához (187). Kísérleteinkben a DEX kezelés a *PER2* expressziót is megnövelte. A glükokortikoidok a *PER2* gént sajátos módon, a promoterben található ARNTL dependens GRE-en keresztül képesek aktiválni (187,188). A Period gén mellett megfigyeltük a *CRY1* GR dependens indukcióját is. Reddy és munkatársai *in silico* analízis során konzervált GRE kötőhelyet azonosítottak a *CRY1* promoterében. Érdekes módon azonban a H295R mellékvese, valamint máj sejteken kívül eddig nem sikerült más sejttípusokban is megfigyelni a glükokortikoidok *CRY1* aktiváló hatását (30,116,117,187). Mindezek alapján a glükokortikoidok sejtspecifikus vagy dózis-függő módon szabályozhatják a *CRY1* gén transzkripcióját. Kísérleteinkben megfigyeltük a *REV-ERB α* gén gátlását 6 órás glükokortikoid kezelést követően. Ehhez hasonlóan a GR aktiváció, a *REV-ERB α* gén promoterében található nGRE-n keresztül csökkentette a transzkripciót májsejtekben is (26,184). Mindezen kívül 2 órás DEX kezelést követően a *REV-ERB α* és *ARNTL* gének ideiglenes, GR független indukcióját figyeltük meg. Összességében úgy gondoljuk, hogy a perifériás óra vezérlése során a glükokortikoidok dózisfüggő módon egyszerre több óragén expresszióját is szabályozzák.

PhD munkám során első alkalommal került vizsgálatra a GR β izoforma szerepe az óragének szabályozásában. Krónikusan emelkedett glükokortikoid szintek mellett és

számos autoimmun kórképben is fokozott a GR β expresszió. Továbbá egyes proinflammatorikus citokinek is növelhetik a GR β expresszióját. (összegezve Szappanos et al., 2015; Webster et al., 2001). Kísérleteim során a H295R sejteket GR β -t overexpresszáló plazmiddal transzfektáltam, majd megvizsgáltam az óragének transzkripciójára gyakorolt hatását. Kimutattam, hogy a GR β izoforma önmagában nem befolyásolja az óragének expresszióját, azonban kivédi a DEX *REV-ERB α* szuppressziót okozó hatását. Ennek hátterében a GR β GR α antagonista mechanizmusa állhat. Meglepő módon ugyanakkor a GR β overexpresszió nem képes kivédeni a glükokortikoidok *PER1* és *PER2* indukáló hatását. Reddy és munkatársai kimutatták, hogy a *PER1* promotere hiperérzékeny a glükokortikoidokkal szemben (30). Elképzelhető, hogy a *PER1* és *PER2* gének jóval érzékenyebben reagáltak a glükokortikoidokra, mint a *REV-ERB α* , így a GR β inkomplett és tranziens transzfekciója nem volt elegendő a GR α antagonista hatás kifejtéséhez. Eredményeink alapján a GR β túltermelés módosíthatja a glükokortikoidok perifériás óragénekre gyakorolt hatását, azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy megértsük a GR β jelentőségét az óragének szabályozásában

VI. Következtetések

A GR α és GR β izoformák transzkripciós szabályozó hatásának vizsgálata során, kísérleteimből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A Caco-2GR β sejtvonal alkalmas a GR β túltermelés hatására kialakuló glükokortikoid-rezisztencia további vizsgálatára. Korábbi irodalmi adatok és saját vizsgálataim alapján a GR β izoforma GR α antagonistá funkciója állhat a glükokortikoid-inszenzitivitás kialakulásának hátterében.

2. A GR β génspecifikus módon a GR α -val azonos irányban vagy ellentétesen is, és a GR α -tól függetlenül, önállóan is képes a géntranszkripció szabályozására.

3. A GR β túltermelés számos olyan gén transzkripcióját szabályozta, melyek az IBD-ben szenvedő betegek bélhámshövetében az egészségesekéhez képest is eltérően expresszálódtak. Funkcionális elemzés során ezek a közös gének a sejtszaporodásban, a sejtmigrációban és a sejt-sejt interakcióban vesznek részt. Ezek a folyamatok fontos szerepet játszanak a bélhámshövet ép barrier funkciójának fenntartásában.

4. A GR β izoforma túltermelése morfológiai változásokat idézett elő a sejtekben és csökkentette azok proliferációs aktivitását. A GR β sejtproliferációt gátló hatásának hátterében számos, a sejt növekedésben és proliferációban szerepet játszó gén GR β hatására megváltozott transzkripciója állhat. Mindezek felvetik, hogy a GR β izoformának a sejtszaporodás gátlásán keresztül potenciális tumorszuppresszor szerepe is lehet. Ez a hipotézis azonban még további vizsgálatokat igényel, melyet a munkacsoportunk a későbbiekben tovább szeretne vizsgálni.

5. A perifériás cirkadián óra indukálható H295R sejtekben. A ritmus kialakításában a szérumsokk/szérumsó éheztetés alkalmazásának volt szerepe, a H295R sejtek endogén kortizol, tesztoszteron és progeszteron termelése nem volt hatással a ritmus kialakítására.

6. A GR α izoforma egyidejűleg, közvetlenül több óragén transzkripcióját is befolyásolta. A GR α aktivációt követően a *PER1*, *PER2* és *CRY1* gének stimulálódnak, míg a *REV-ERB α* gén expressziója gátolt. A GR β izoforma önmagában nem befolyásolta az óragének transzkripcióját, azonban feltételezhetően GR α antagonistá hatásának következtében, a *REV-ERB α* -án keresztül megváltoztatja a glükokortikoidok óragéneket szabályozó hatását.

VII. Összefoglalás

A glükokortikoidok, több mint 70 éve történt felfedezésük ellenére még mindig intenzív kutatások tárgyát képezik. Dolgozatomban a két leggyakrabban tanulmányozott glükokortikoid receptor, a GR α és GR β transzkripciót szabályozó szerepét vizsgáltam. A GR β expresszió egyes autoimmun betegségekben, többek között IBD-ben is gyakran emelkedett. Munkacsoportunk létrehozott egy a GR β izoformát stabilan túltermelő Caco-2GR β bélhámsejt vonalat, amelyen a GR β szteroid-inszenzitivitás kialakulásában, valamint a génexpresszió szabályozásában betöltött szerepét tanulmányoztam. A GR β fehérje glükokortikoidok hiányában is elsősorban a sejtmagban helyezkedett el. A GR β túltermelés meggátolta a DEX kezelést követő GR α aktiváció transzkripciós hatásait, ezáltal glükokortikoid-inszenzítívvé változtatta a sejteket. Ezen kívül a GR β számos gén expresszióját a GR α -tól függetlenül, önállóan is szabályozta. A GR β által Caco-2GR β sejtekben szabályozott gének közel 10%-a az IBD-ben szenvedő betegek bélhámşövetében is eltérést mutatott. Ezek elsősorban a sejtproliferációban, a sejtmigrációban és a sejt-sejt közötti interakciókban vesznek részt. Mindezek alapján a GR β túltermelés a glükokortikoid-inszenzitivitáson túl egyéb, eddig ismeretlen változásokat is okozhat a bélhámşövetben, melyek szerepet játszhatnak az IBD patogenezisében.

Mellékvese daganatokban a kortizol szekréció diurnális ritmusa gyakran megszűnik és a HPA tengelytől független autonóm regulációs mechanizmusok befolyásolják a hormontermelést. A mellékvesében található cirkadián óra fontos szerepet tölt be a kortizol ritmikus elválasztásában, ugyanakkor a glükokortikoidok is képesek szabályozni a cirkadián órát. Nem teljesen ismert, hogy a glükokortikoidok milyen szerepet töltenek be az óragének szabályozásában, ezért dolgozatom második részében a GR α és GR β izoformák hatását vizsgáltam H295R sejtvonalban. Kísérleteimmel, első alkalommal igazoltam, hogy a H295R sejtek rendelkeznek funkcionális cirkadián órával. A glükokortikoidok a GR α -n keresztül H295R mellékvesekéreg sejtekben egyidejűleg több óragén expresszióját is szabályozzák, ugyanakkor a sejtek endogén kortizol termelése nem elegendő a ritmus kialakításához. A fokozott GR β termelés az óragének transzkripciója közül a REV-ERB α -n keresztül megváltoztatta az óragének glükokortikoidok által történő szabályozását.

VIII. Summary

Glucocorticoids, even though their discovery for more than 70 years ago, are still extensively studied. I evaluated the transcriptional effects of the two most frequently examined glucocorticoid receptor isoforms: GR α and GR β . GR β expression was frequently elevated in certain autoimmune diseases, including IBD. Our workgroup developed a stable GR β overexpressing intestinal cell line (Caco-2GR β) as a novel tool for investigation of the role of GR β in the regulation of gene expression. GR β was located in the nucleus of Caco-2GR β cells even in the absence of glucocorticoids. After DEX treatment the overexpression of GR β inhibited the GR α -dependent function and rendered these cells glucocorticoid insensitive. My data further confirmed that GR β had a GR α independent effect on gene transcription. The 10% of genes affected by GR β overexpression in Caco-2 cells were also differentially expressed in colonic mucosa samples obtained from IBD patients compared to healthy intestine samples. These genes play roles in the regulation of cell proliferation, cell migration and cell-cell interactions. These findings indicate that elevated GR β expression apart from glucocorticoid insensitivity may be involved in yet not characterized transcriptional changes in the intestine which may have an important role in the pathogenesis of IBD.

The diurnal excretion of cortisol is often disturbed in adrenal neoplasms and the HPA independent cell autonomus mechanisms regulate the production of glucocorticoids. The circadian clock in the adrenal cortex plays an important role in the circadian secretion of cortisol, meanwhile glucocorticoids are able to regulate the circadian clock. However the mechanism of regulation of clock genes by glucocorticoid is less known, therefore in the second part of my dissertation I evaluated the regulation of clock genes by GR α and GR β in H295R cells. I confirmed for the first time that a functional peripheral clock is present in the adrenocortical H295R cells. Glucocorticoids through the GR α simultaneously affect the transcription of multiple clock genes, nevertheless endogenous cortisol production of H295R cells was not sufficient to induce the rhythmic expression of clock genes. I evaluated for the first time the effects of GR β overexpression on clock genes and my data showed that the GR β isoform may modify the entrainment of peripheral clocks by glucocorticoids through *REV-ERB α* .

IX. Irodalomjegyzék

1. Hench, P. S. & Kendall, E. C. (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 24: 181–97
2. Rose, A. J., Vegiopoulos, A. & Herzig, S. (2010) Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 122: 10–20
3. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 132: 1033–44
4. Biddie, S. C., Conway-Campbell, B. L. & Lightman, S. L. (2012) Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford)*, 51: 403–12
5. Gláz, E. (2016). in *Tulassay Z (szerk), A belgyógyászat alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest* 1644–1650
6. Dickmeis, T., Weger, B. D. & Weger, M. (2013) The circadian clock and glucocorticoids--interactions across many time scales. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 380: 2–15
7. Stavreva, D. A., Wiench, M., John, S., Conway-Campbell, B. L., McKenna, M. A., Pooley, J. R., Johnson, T. A., Voss, T. C., Lightman, S. L. & Hager, G. L. (2009) Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat. Cell Biol.*, 11: 1093–102
8. Young, E. A., Abelson, J. & Lightman, S. L. (2004) Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front. Neuroendocrinol.*, 25: 69–76
9. Jarcho, M. R., Slavich, G. M., Tylova-Stein, H., Wolkowitz, O. M. & Burke, H. M. (2013) Dysregulated diurnal cortisol pattern is associated with glucocorticoid resistance in women with major depressive disorder. *Biol. Psychol.*, 93: 150–8
10. Perry, M. G., Kirwan, J. R., Jessop, D. S. & Hunt, L. P. (2008) Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 68: 63–68
11. Carroll, T., Raff, H. & Findling, J. W. (2008) Late-night salivary cortisol

- measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 4: 344–50
12. HAUTANEN, A. & ADLERCREUTZ, H. (1993) Altered adrenocorticotropin and Cortisol secretion in abdominal obesity: implications for the insulin resistance syndrome. *J. Intern. Med.*, 234: 461–469
 13. Invitti, C., De Martin, M., Delitala, G., Veldhuis, J. D. & Cavagnini, F. (1998) Altered morning and nighttime pulsatile corticotropin and cortisol release in polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 47: 143–148
 14. Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Brad Thompson, E., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318: 635–641
 15. Encío, I. J. & Detera-Wadleigh, S. D. (1991) The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 266: 7182–8
 16. Theriault, A., Boyd, E., Harrap, S. B., Hollenberg, S. M. & Connor, J. M. (1989) Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Hum. Genet.*, 83: 289–291
 17. Duma, D., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. (2006) Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 102: 11–21
 18. Kumar, R. & Thompson, E. B. (2005) Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 94: 383–94
 19. Rogatsky, I., Wang, J.-C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C. M., Darimont, B. D., Garabedian, M. J. & Yamamoto, K. R. (2003) Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 13845–50
 20. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. (2014) Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.*, 35: 671–693
 21. Zhou, J. & Cidlowski, J. A. (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 70: 407–17

22. Nader, N., Chrousos, G. P. & Kino, T. (2009) Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J.*, 23: 1572–83
23. Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18: 306–60
24. Freeman, B. C. & Yamamoto, K. R. (2001) Continuous recycling: a mechanism for modulatory signal transduction. *Trends Biochem. Sci.*, 26: 285–290
25. Schiller, B. J., Chodankar, R., Watson, L. C., Stallcup, M. R. & Yamamoto, K. R. (2014) Glucocorticoid receptor binds half sites as a monomer and regulates specific target genes. *Genome Biol.*, 15: 418
26. Surjit, M., Ganti, K. P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M. & Chambon, P. (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, 145: 224–41
27. John, S., Sabo, P. J., Thurman, R. E., Sung, M.-H., Biddie, S. C., Johnson, T. A., Hager, G. L. & Stamatoyannopoulos, J. A. (2011) Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.*, 43: 264–8
28. Reddy, T. E., Pauli, F., Sprouse, R. O., Neff, N. F., Newberry, K. M., Garabedian, M. J. & Myers, R. M. (2009) Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.*, 19: 2163–71
29. Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I. M. & De Bosscher, K. (2013) How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 380: 41–54
30. Reddy, T. E., Gertz, J., Crawford, G. E., Garabedian, M. J. & Myers, R. M. (2012) The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes. *Mol. Cell. Biol.*, 32: 3756–67
31. Biddie, S. C., John, S., Sabo, P. J., Thurman, R. E., Johnson, T. A., Schiltz, R. L., Miranda, T. B., Sung, M.-H., Trump, S., Lightman, S. L., Vinson, C., Stamatoyannopoulos, J. A. & Hager, G. L. (2011) Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding. *Mol.*

Cell, 43: 145–55

32. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.*, 24: 488–522
33. Engblom, D., Kornfeld, J.-W., Schwake, L., Tronche, F., Reimann, A., Beug, H., Hennighausen, L., Moriggl, R. & Schütz, G. (2007) Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev.*, 21: 1157–62
34. Smoak, K. & Cidlowski, J. A. (2006) Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 9126–35
35. Ishmael, F. T., Fang, X., Houser, K. R., Pearce, K., Abdelmohsen, K., Zhan, M., Gorospe, M. & Stellato, C. (2011) The human glucocorticoid receptor as an RNA-binding protein: global analysis of glucocorticoid receptor-associated transcripts and identification of a target RNA motif. *J. Immunol.*, 186: 1189–98
36. Haller, J., Mikics, E. & Makara, G. B. (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrinol.*, 29: 273–91
37. Borski, R. J. (2000) Nongenomic Membrane Actions of Glucocorticoids in Vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11: 427–436
38. Solito, E., Mulla, A., Morris, J. F., Christian, H. C., Flower, R. J. & Buckingham, J. C. (2003) Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and . *Endocrinology*, 144: 1164–74
39. Strehl, C. & Buttgereit, F. (2014) Unraveling the functions of the membrane-bound glucocorticoid receptors: first clues on origin and functional activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1318: 1–6
40. Chrousos, G. P. & Kino, T. (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci. STKE*, 2005: pe48
41. Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., de Castro, M. & Chrousos, G. P. (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid

- action in humans. *J. Clin. Invest.*, 95: 2435–41
42. Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M. & Cidlowski, J. A. (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.*, 274: 27857–66
 43. Castro, M. De, Elliot, S., Kino, T., Bamberger, C., Karl, M., Webster, E. & Chrousos, G. P. (1996) The non-ligand binding β -Isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR β): tissue Levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol. Med.*, 2: 597–607
 44. Yudt, M. R., Jewell, C. M., Bienstock, R. J. & Cidlowski, J. A. (2003) Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 4319–30
 45. Kino, T., Su, Y. a & Chrousos, G. P. (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 3435–48
 46. Strickland, I., Kisich, K., Hauk, P. J., Vottero, A., Chrousos, G. P., Klemm, D. J. & Leung, D. Y. (2001) High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J. Exp. Med.*, 193: 585–93
 47. Charmandari, E., Chrousos, G. P., Ichijo, T., Bhattacharyya, N., Vottero, A., Souvatzoglou, E. & Kino, T. (2005) The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol. Endocrinol.*, 19: 52–64
 48. Lewis-Tuffin, L. J., Jewell, C. M., Bienstock, R. J., Collins, J. B. & Cidlowski, J. A. (2007) Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 2266–82
 49. Kino, T., Manoli, I., Kelkar, S., Wang, Y., Su, Y. A. & Chrousos, G. P. (2009) Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381: 671–5
 50. Nagy, Z., Acs, B., Butz, H., Feldman, K., Marta, A., Szabo, P. M., Baghy, K., Pazmany, T., Racz, K., Liko, I. & Patocs, A. (2016) Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J. Steroid Biochem. Mol.*

- Biol., 155: 76–84
51. Kelly, A., Bowen, H., Jee, Y.-K., Mahfiche, N., Soh, C., Lee, T., Hawrylowicz, C. & Lavender, P. (2008) The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121: 203–208.e1
 52. Stechschulte, L. A., Wuescher, L., Marino, J. S., Hill, J. W., Eng, C. & Hinds, T. D. (2014) Glucocorticoid receptor β stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN. *J. Biol. Chem.*, 289: 17885–94
 53. Thomas-Chollier, M., Watson, L. C., Cooper, S. B., Pufall, M. a, Liu, J. S., Borzym, K., Vingron, M., Yamamoto, K. R. & Meijsing, S. H. (2013) A naturally occurring insertion of a single amino acid rewires transcriptional regulation by glucocorticoid receptor isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110: 17826–31
 54. Rivers, C., Levy, A., Hancock, J., Lightman, S. & Norman, M. (1999) Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 4283–6
 55. Taniguchi, Y., Iwasaki, Y., Tsugita, M., Nishiyama, M., Taguchi, T., Okazaki, M., Nakayama, S., Kambayashi, M., Hashimoto, K. & Terada, Y. (2010) Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology*, 151: 3204–13
 56. Pujols, L., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Torrego, A., Xaubet, A., Cidlowski, J. A. & Picado, C. (2002) Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283: C1324-31
 57. Oakley, R. H., Webster, J. C., Sar, M., Parker, C. R. & Cidlowski, J. A. (1997) Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 138: 5028–38
 58. Hinds, T. D., Ramakrishnan, S., Cash, H. A., Stechschulte, L. A., Heinrich, G., Najjar, S. M. & Sanchez, E. R. (2010) Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol. Endocrinol.*, 24: 1715–27
 59. Szappanos, Á., Nagy, Z., Kovács, B., Poór, G., Tóth, M., Rácz, K., Kiss, E. & Patócs, A. (2015) Tissue-specific glucocorticoid signaling may determine the resistance against glucocorticoids in autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.*,

22: 1126–1135

60. Goleva, E., Li, L.-B., Eves, P. T., Strand, M. J., Martin, R. J. & Leung, D. Y. M. (2006) Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 173: 607–16
61. Leung, D. Y., Hamid, Q., Vottero, A., Szeffler, S. J., Surs, W., Minshall, E., Chrousos, G. P. & Klemm, D. J. (1997) Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J. Exp. Med.*, 186: 1567–74
62. Hamid, Q. A., Wenzel, S. E., Hauk, P. J., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Lafitte, J. J., Chrousos, G. P., Szeffler, S. J. & Leung, D. Y. (1999) Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 159: 1600–4
63. Kozaci, D. L., Chernajovsky, Y. & Chikanza, I. C. (2007) The differential expression of corticosteroid receptor isoforms in corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 46: 579–85
64. Towers, R., Naftali, T., Gabay, G., Carlebach, M., Klein, A. & Novis, B. (2005) High levels of glucocorticoid receptors in patients with active Crohn's disease may predict steroid resistance. *Clin. Exp. Immunol.*, 141: 357–62
65. Honda, M., Orii, F., Ayabe, T., Imai, S., Ashida, T., Obara, T. & Kohgo, Y. (2000) Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 118: 859–66
66. Webster, J. C., Oakley, R. H., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. (2001) Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 6865–70
67. Shahidi, H., Vottero, A., Stratakis, C. A., Taymans, S. E., Karl, M., Longui, C. A., Chrousos, G. P., Daughaday, W. H., Gregory, S. A. & Plate, J. M. (1999) Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254: 559–65
68. Koga, Y., Matsuzaki, A., Suminoe, A., Hattori, H., Kanemitsu, S. & Hara, T.

- (2005) Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr. Blood Cancer*, 45: 121–7
69. Lewis-Tuffin, L. J. & Cidlowski, J. a. (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1069: 1–9
 70. Nagy, F. (2016). *Gyulladásos bélbetegségek. Tulassay Z (szerk), A belgyógyászat alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest*
 71. C., M., a., C., a., W., T., A., I., A., R., D., S., M., T., O., M., R., L., Y., C., L., G.-T., H., J., S. & S., B. (2011) Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 60: 571–607
 72. Schreiber, S., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Hampe, J. & Krawczak, M. (2005) Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat. Rev. Genet.*, 6: 376–88
 73. Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. & Sansonetti, P. J. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 278: 8869–72
 74. Siminovitch, K. A. (2006) Advances in the molecular dissection of inflammatory bowel disease. *Semin. Immunol.*, 18: 244–53
 75. Glas, J., Seiderer, J., Wetzke, M., Konrad, A., Török, H.-P., Schmechel, S., Tonenchi, L., Grassl, C., Dambacher, J., Pfennig, S., Maier, K., Griga, T., Klein, W., Epplen, J. T., Schiemann, U., Folwaczny, C., Lohse, P., Göke, B., Ochsenkühn, T., Müller-Myhsok, B., Folwaczny, M., Mussack, T. & Brand, S. (2007) rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One*, 2: e819
 76. Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Ho, G.-T., Arnott, I. D., Wilson, D. C. & Satsangi, J. (2007) Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 13: 338–55
 77. Molodecky, N. A. & Kaplan, G. G. (2010) Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*, 6: 339–46

78. Lakatos, P. L., Szamosi, T. & Lakatos, L. (2007) Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J. Gastroenterol.*, 13: 6134–9
79. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448: 427–34
80. Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R. & Di Sabatino, A. (2014) Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.*, 13: 3–10
81. Wright, E. K., Kamm, M. A., Teo, S. M., Inouye, M., Wagner, J. & Kirkwood, C. D. (2015) Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, 21: 1219–1228
82. Toedter, G., Li, K., Sague, S., Ma, K., Marano, C., Macoritto, M., Park, J., Deehan, R., Matthews, A., Wu, G. D., Lewis, J. D., Arijs, I., Rutgeerts, P. & Baribaud, F. (2012) Genes associated with intestinal permeability in ulcerative colitis: changes in expression following infliximab therapy. *Inflamm. Bowel Dis.*, 18: 1399–410
83. Sánchez de Medina, F., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C. & Martínez-Augustin, O. (2014) Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm. Bowel Dis.*, 20: 2394–404
84. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, 353: 1711–23
85. Farrell, R. J. & Kelleher, D. (2003) Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J. Endocrinol.*, 178: 339–346
86. De Bosscher, K., Beck, I. M., Dejager, L., Bougarne, N., Gaigneaux, A., Chateauvieux, S., Ratman, D., Bracke, M., Tavernier, J., Vanden Berghe, W., Libert, C., Diederich, M. & Haegeman, G. (2014) Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- κ B and AP-1. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71: 143–63
87. Barnes, P. J. & Adcock, I. M. (2009) Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 373: 1905–17
88. Fischer, A., Gluth, M., Weege, F., Pape, U.-F., Wiedenmann, B., Baumgart, D. C. & Theuring, F. (2014) Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest.*

Liver Physiol., 306: G218-28

89. Boivin, M. A., Ye, D., Kennedy, J. C., Al-Sadi, R., Shepela, C. & Ma, T. Y. (2007) Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292: G590-8
90. De Iudicibus, S., Franca, R., Martelossi, S., Ventura, A. & Decorti, G. (2011) Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 17: 1095–108
91. Maltese, P., Palma, L., Sfara, C., de Rocco, P., Latiano, A., Palmieri, O., Corritore, G., Annese, V. & Magnani, M. (2012) Glucocorticoid resistance in Crohn's disease and ulcerative colitis: an association study investigating GR and FKBP5 gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J.*, 12: 432–8
92. De Iudicibus, S., Stocco, G., Martelossi, S., Londero, M., Ebner, E., Pontillo, A., Lionetti, P., Barabino, A., Bartoli, F., Ventura, A. & Decorti, G. (2011) Genetic predictors of glucocorticoid response in pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *J. Clin. Gastroenterol.*, 45: e1-7
93. Zhang, H., Ouyang, Q., Wen, Z.-H., Fiocchi, C., Liu, W.-P., Chen, D.-Y. & Li, F.-Y. (2005) Significance of glucocorticoid receptor expression in colonic mucosal cells of patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.*, 11: 1775–8
94. Konopka, R. J. & Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 68: 2112–6
95. Pittendrigh, C. S. (1993) TEMPORAL ORGANIZATION : Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 17–54
96. Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.*, 72: 517–49
97. Tonsfeldt, K. J. & Chappell, P. E. (2012) Clocks on top: the role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 349: 3–12
98. Mohawk, J. a., Green, C. B. & Takahashi, J. S. (2012) Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annu. Rev. Neurosci.*, 35: 445–462
99. Tahara, Y., Kuroda, H., Saito, K., Nakajima, Y., Kubo, Y., Ohnishi, N., Seo, Y.,

- Otsuka, M., Fuse, Y., Ohura, Y., Komatsu, T., Moriya, Y., Okada, S., Furutani, N., Hirao, A., Horikawa, K., Kudo, T. & Shibata, S. (2012) In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr. Biol.*, 22: 1029–34
100. Richards, J. & Gumz, M. L. (2012) Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB J.*, 26: 3602–3613
 101. Welsh, D. K., Yoo, S.-H., Liu, A. C., Takahashi, J. S. & Kay, S. A. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.*, 14: 2289–95
 102. Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Slepka, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. & Takahashi, J. S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 5339–46
 103. Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F. & Schibler, U. (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119: 693–705
 104. Aurélio Balsalobre, F. D. & Schibler, U. (1998) A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell*, 93: 929–937
 105. Balsalobre, a, Brown, S. a, Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G. & Schibler, U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289: 2344–2347
 106. Ko, C. H. & Takahashi, J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 15 Spec No: R271-7
 107. Mehta, N. & Cheng, H.-Y. M. (2013) Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J. Mol. Biol.*, 425: 3609–24
 108. Lee, C., Etchegaray, J., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I. & Reppert, S. M. (2001) Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, 107: 855–867
 109. Zsolt, N., Károly, R. & Attila, P. (2014) A perifériás cirkadián órák jelentősége az anyagcsere zavarok kialakulásában. *Magy. Belorv. Arch.*, 67:

110. Bando, H., Nishio, T., van der Horst, G. T. J., Masubuchi, S., Hisa, Y. & Okamura, H. (2007) Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J. Neurosci.*, 27: 4359–65
111. Cailotto, C., Lei, J., van der Vliet, J., van Heijningen, C., van Eden, C. G., Kalsbeek, A., Pévet, P. & Buijs, R. M. (2009) Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS One*, 4: e5650
112. Nader, N., Chrousos, G. P. & Kino, T. (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 21: 277–286
113. Urlep, Z. & Rozman, D. (2013) The Interplay between Circadian System, Cholesterol Synthesis, and Steroidogenesis Affects Various Aspects of Female Reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 4: 111
114. Kawamura, M., Tasaki, H., Misawa, I., Chu, G., Yamauchi, N. & Hattori, M.-A. (2014) Contribution of testosterone to the clock system in rat prostate mesenchyme cells. *Andrology*, 2: 225–33
115. Pezük, P., Mohawk, J. A., Wang, L. A. & Menaker, M. (2012) Glucocorticoids as entraining signals for peripheral circadian oscillators. *Endocrinology*, 153: 4775–83
116. Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. a, King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P. & Hastings, M. H. (2007) Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology*, 45: 1478–1488
117. Cuesta, M., Cermakian, N. & Boivin, D. B. (2015) Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *FASEB J.*, 29: 1360–70
118. Ajabnoor, G. M., Bahijri, S., Borai, A., Abdulkhaliq, A. A., Al-Aama, J. Y. & Chrousos, G. P. (2014) Health impact of fasting in Saudi Arabia during Ramadan: association with disturbed circadian rhythm and metabolic and sleeping patterns. *PLoS One*, 9: e96500
119. Maury, E., Ramsey, K. M. & Bass, J. (2010) Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ. Res.*, 106: 447–62
120. Pan, A., Schernhammer, E. S., Sun, Q. & Hu, F. B. (2011) Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS*

Med., 8: e1001141

121. Kelleher, F. C., Rao, A. & Maguire, A. (2014) Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett.*, 342: 9–18
122. Scheer, F. A. J. L., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S. & Shea, S. A. (2009) Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 4453–8
123. Möller-Levet, C. S., Archer, S. N., Bucca, G., Laing, E. E., Slak, A., Kabiljo, R., Lo, J. C. Y., Santhi, N., von Schantz, M., Smith, C. P. & Dijk, D.-J. (2013) Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110: E1132–41
124. Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptáček, L. J. & Fu, Y. H. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291: 1040–3
125. Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H. & Weitz, C. J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417: 78–83
126. Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcaková, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M. W. & Eichele, G. (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.*, 4: 163–173
127. Son, G. H., Chung, S., Choe, H. K., Kim, H.-D., Baik, S.-M., Lee, H., Lee, H.-W., Choi, S., Sun, W., Kim, H., Cho, S., Lee, K. H. & Kim, K. (2008) Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105: 20970–20975
128. Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., van der Horst, G. T. J. & Okamura, H. (2010) Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.*, 16: 67–74
129. Duez, H., van der Veen, J. N., Duhem, C., Pourcet, B., Touvier, T., Fontaine, C., Derudas, B., Bauge, E., Havinga, R., Bloks, V. W., Wolters, H., van der Sluijs, F.

- H., Vennström, B., Kuipers, F. & Staels, B. (2008) Regulation of Bile Acid Synthesis by the Nuclear Receptor Rev-erb α . *Gastroenterology*, 135: 689–98
130. Zhou, B., Zhang, Y., Zhang, F., Xia, Y., Liu, J., Huang, R., Wang, Y., Hu, Y., Wu, J., Dai, C., Wang, H., Tu, Y., Peng, X., Wang, Y. & Zhai, Q. (2014) CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. *Hepatology*, 59: 2196–206
 131. Lee, J., Moulik, M., Fang, Z., Saha, P., Zou, F., Xu, Y., Nelson, D. L., Ma, K., Moore, D. D. & Yechoor, V. K. (2013) Bmal1 and β -cell clock are required for adaptation to circadian disruption, and their loss of function leads to oxidative stress-induced β -cell failure in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 33: 2327–38
 132. Leliavski, A., Shostak, A., Husse, J. & Oster, H. (2014) Impaired glucocorticoid production and response to stress in Arntl-deficient male mice. *Endocrinology*, 155: 133–42
 133. Ota, T., Fustin, J. M., Yamada, H., Doi, M. & Okamura, H. (2012) Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 349: 30–37
 134. Vieira, E., Marroquí, L., Batista, T. M., Caballero-Garrido, E., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Nadal, A. & Quesada, I. (2012) The clock gene Rev-erb α regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*, 153: 592–601
 135. Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A. U., Wheeler, E., ... Barroso, I. (2010) New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.*, 42: 105–16
 136. Pilorz, V. & Steinlechner, S. (2008) Low reproductive success in Per1 and Per2 mutant mouse females due to accelerated ageing? *Reproduction*, 135: 559–68
 137. Zhang, J., Ding, X., Li, Y., Xia, Y., Nie, J., Yi, C., Wang, X. & Tong, J. (2012) Association of CLOCK gene variants with semen quality in idiopathic infertile Han-Chinese males. *Reprod. Biomed. Online*, 25: 536–42
 138. Hodžić, A., Ristanović, M., Zorn, B., Tulić, C., Maver, A., Novaković, I. & Peterlin, B. (2013) Genetic variation in circadian rhythm genes CLOCK and ARNTL as risk factor for male infertility. *PLoS One*, 8: e59220
 139. Gómez-Santos, C., Gómez-Abellán, P., Madrid, J. A., Hernández-Morante, J. J.,

- Lujan, J. A., Ordovas, J. M. & Garaulet, M. (2009) Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. *Obesity (Silver Spring)*, 17: 1481–5
140. Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R. T., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L.-W., DiTacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S. & Evans, R. M. (2012) Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*, 485: 123–127
 141. Chen, P., Kakan, X., Wang, S., Dong, W., Jia, A., Cai, C. & Zhang, J. (2013) Deletion of clock gene *Per2* exacerbates cholestatic liver injury and fibrosis in mice. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Gesellschaft für Toxikologische Pathol.*, 65: 427–32
 142. Stow, L. R., Richards, J., Cheng, K.-Y., Lynch, I. J., Jeffers, L. A., Greenlee, M. M., Cain, B. D., Wingo, C. S. & Gumz, M. L. (2012) The circadian protein period 1 contributes to blood pressure control and coordinately regulates renal sodium transport genes. *Hypertension*, 59: 1151–6
 143. Solocinski, K., Richards, J., All, S., Cheng, K.-Y., Khundmiri, S. J. & Gumz, M. L. (2015) Transcriptional regulation of NHE3 and SGLT1 by the circadian clock protein *Per1* in proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 309: F933–42
 144. Bando, H., Nishio, T., van der Horst, G. T. J., Masubuchi, S., Hisa, Y. & Okamura, H. (2007) Vagal regulation of respiratory clocks in mice. *J. Neurosci.*, 27: 4359–65
 145. Andrews, J. L., Zhang, X., McCarthy, J. J., McDearmon, E. L., Hornberger, T. A., Russell, B., Campbell, K. S., Arbogast, S., Reid, M. B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Takahashi, J. S. & Esser, K. A. (2010) CLOCK and BMAL1 regulate *MyoD* and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107: 19090–5
 146. Harfmann, B. D., Schroder, E. A. & Esser, K. A. (2015) Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *J. Biol. Rhythms*, 30: 84–94
 147. Fu, L., Patel, M. S., Bradley, A., Wagner, E. F. & Karsenty, G. (2005) The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell*, 122: 803–15
 148. Samsa, W. E., Vasanji, A., Midura, R. J. & Kondratov, R. V. (2016) Deficiency of circadian clock protein BMAL1 in mice results in a low bone mass phenotype.

- Bone, 84: 194–203
149. Borgs, L., Beukelaers, P., Vandenbosch, R., Belachew, S., Nguyen, L. & Malgrange, B. (2009) Cell circadian cycle: New role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle* 8: 832–837
 150. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. & Lee, C. (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111: 41–50
 151. Gery, S. & Koeffler, H. P. (2010) Circadian rhythms and cancer. *Cell Cycle*, 9: 1097–1103
 152. Refinetti, R., Lissen, G. C. & Halberg, F. (2007) Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol. Rhythm Res.*, 38: 275–325
 153. Grolmusz, V. K., Karászi, K., Micsik, T., Tóth, E. A., Mészáros, K., Karvaly, G., Barna, G., Szabó, P. M., Baghy, K., Matkó, J., Kovalszky, I., Tóth, M., Rácz, K., Igaz, P. & Patócs, A. (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am. J. Cancer Res.*, 6: 2041–2053
 154. He, B., Cruz-Topete, D., Oakley, R. H., Xiao, X. & Cidlowski, J. A. (2015) Human Glucocorticoid Receptor β Regulates Gluconeogenesis and Inflammation in Mouse Liver. *Mol. Cell. Biol.*, 36: 714–30
 155. Zhang, X., Clark, A. F. & Yorlío, T. (2008) FK506-binding protein 51 regulates nuclear transport of the glucocorticoid receptor beta and glucocorticoid responsiveness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49: 1037–47
 156. Fujishima, S., Takeda, H., Kawata, S. & Yamakawa, M. (2009) The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin. Immunol.*, 133: 208–17
 157. Hidalgo, I. J., Raub, T. J. & Borchardt, R. T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96: 736–49
 158. Boyd, M., Coskun, M., Lilje, B., Andersson, R., Hoof, I., Bornholdt, J., Dahlggaard, K., Olsen, J., Vitezic, M., Bjerrum, J. T., Seidelin, J. B., Nielsen, O. H., Troelsen, J. T. & Sandelin, A. (2014) Identification of TNF- α -responsive

- promoters and enhancers in the intestinal epithelial cell model Caco-2. *DNA Res.*, 21: 569–83
159. Araki, Y., Sugihara, H. & Hattori, T. (2006) In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. *Oncol. Rep.*, 16: 1357–62
 160. Heilmann, K., Hoffmann, U., Witte, E., Loddenkemper, C., Sina, C., Schreiber, S., Hayford, C., Holzlöhner, P., Wolk, K., Tchatchou, E., Moos, V., Zeitz, M., Sabat, R., Günthert, U. & Wittig, B. M. (2009) Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation. *J. Cell. Mol. Med.*, 13: 1162–74
 161. Mor-Vaknin, N., Legendre, M., Yu, Y., Serezani, C. H. C., Garg, S. K., Jatzek, A., Swanson, M. D., Gonzalez-Hernandez, M. J., Teitz-Tennenbaum, S., Punturieri, A., Engleberg, N. C., Banerjee, R., Peters-Golden, M., Kao, J. Y. & Markovitz, D. M. (2013) Murine colitis is mediated by vimentin. *Sci. Rep.*, 3: 1045
 162. Ng, Y.-L., Klopčič, B., Lloyd, F., Forrest, C., Greene, W. & Lawrance, I. C. (2013) Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) exacerbates colonic inflammatory symptoms in dextran sodium sulphate-induced murine colitis. *PLoS One*, 8: e77575
 163. Wu, F. & Chakravarti, S. (2007) Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. *J. Immunol.*, 179: 6988–7000
 164. Shimshoni, E., Yablecovitch, D., Baram, L., Dotan, I. & Sagi, I. (2015) ECM remodelling in IBD: innocent bystander or partner in crime? The emerging role of extracellular molecular events in sustaining intestinal inflammation. *Gut*, 64: 367–72
 165. Fahrenkrug, J., Hannibal, J. & Georg, B. (2008) Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *J. Neuroendocrinol.*, 20: 323–329
 166. Lemos, D. R., Downs, J. L. & Urbanski, H. F. (2006) Twenty-four-hour rhythmic gene expression in the rhesus macaque adrenal gland. *Mol. Endocrinol.*, 20: 1164–76
 167. Oster, H., Damerow, S., Hut, R. A. & Eichele, G. (2006) Transcriptional

- profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *J. Biol. Rhythms*, 21: 350–61
168. Yoder, J. M., Brandeland, M. & Engeland, W. C. (2014) Phase-dependent resetting of the adrenal clock by ACTH in vitro. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 306: R387-93
 169. Boyle, B., Butz, H., Liko, I., Zalatnai, A., Toth, M., Feldman, K., Horanyi, J., Igaz, P., Racz, K. & Patocs, A. (2010) Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids*, 75: 695–700
 170. Lefebvre, H., Prévost, G. & Louiset, E. (2013) Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur. J. Endocrinol.*, 169: R115-38
 171. Herman, J. P., Watson, S. J., Chao, H. M., Coirini, H. & McEwen, B. S. (1993) Diurnal Regulation of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor mRNAs in Rat Hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.*, 4: 181–90
 172. Xu, R. B., Liu, Z. M. & Zhao, Y. (1991) A study on the circadian rhythm of glucocorticoid receptor. *Neuroendocrinology*, 53 Suppl 1: 31–6
 173. Yao, Z., DuBois, D. C., Almon, R. R. & Jusko, W. J. (2006) Modeling circadian rhythms of glucocorticoid receptor and glutamine synthetase expression in rat skeletal muscle. *Pharm. Res.*, 23: 670–9
 174. Katja A. Lamia, Stephanie J. Papp, Ruth T. Yu, Grant D. Barish, N. H. & Uhlenhaut, Johan W. Jonker, Michael Downes, and R. M. E. (2012) Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature*, 480: 552–556
 175. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. (2013) Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol. Cell. Biol.*, 33: 1711–22
 176. Burnstein, K. L., Bellingham, D. L., Jewell, C. M., Powell-Oliver, F. E. & Cidlowski, J. A. (1991) Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids*, 56: 52–58
 177. Wallace, A. D. & Cidlowski, J. A. (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid

- receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, 276: 42714–21
178. Cao, Q., Gery, S., Dashti, A., Yin, D., Zhou, Y., Gu, J. & Koeffler, H. P. (2009) A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. *Cancer Res.*, 69: 7619–25
 179. Nakamura, T. J., Sellix, M. T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S., Colwell, C. S. & Block, G. D. (2010) Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids*, 75: 203–12
 180. Feillet, C., van der Horst, G. T. J., Levi, F., Rand, D. A. & Delaunay, F. (2015) Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth. *Front. Neurol.*, 6: 96
 181. Yang, J., Kim, K. D., Lucas, A., Drahos, K. E., Santos, C. S., Mury, S. P., Capelluto, D. G. S. & Finkielstein, C. V. (2008) A Novel Heme-Regulatory Motif Mediates Heme-Dependent Degradation of the Circadian Factor Period 2 □. *Mol. Cell. Biol.*, 28: 4697–4711
 182. Raghuram, S., Stayrook, K. R., Huang, P., Rogers, P. M., Amanda, K., McClure, D. B., Burris, L. L., Khorasanizadeh, S., Burris, T. P. & Rastinejad, F. (2007) Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat Struct Mol Biol*, 14: 1207–1213
 183. Yamajuku, D., Inagaki, T., Haruma, T., Okubo, S., Kataoka, Y., Kobayashi, S., Ikegami, K., ... Ueda, H. R. (2012) Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci. Rep.*, 2: 935–941
 184. Torra, S. P., Tsibulsky, V., Delaunay, F., Kosykh, V., Staels, B. & Invern, U. (2000) Circadian and Glucocorticoid Regulation of Rev-erb α Expression in Liver. *Endocrinology*, 141: 3799–3806
 185. Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamine, T. & Takumi, T. (2005) Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.*, 280: 42036–42043
 186. Koyanagi, S., Okazawa, S., Kuramoto, Y., Ushijima, K., Shimeno, H., Soeda, S., Okamura, H. & Ohdo, S. (2006) Chronic treatment with prednisolone represses

- the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol. Endocrinol.*, 20: 573–83
187. So, A. Y.-L., Bernal, T. U., Pillsbury, M. L., Yamamoto, K. R. & Feldman, B. J. (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 17582–7
188. Cheon, S., Park, N., Cho, S. & Kim, K. (2013) Glucocorticoid-mediated *Period2* induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res.*, 41: 6161–74

X. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó saját publikációk jegyzéke:

Nagy, Z., Acs, B., Butz, H., Feldman, K., Marta, A., Szabo, P.M., Baghy, K., Pazmany, T., Racz, K., Liko, I., Patocs, A. Overexpression of GR β in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2016; 155, 76–84 **IF: 3,98**

Nagy Z, Marta A, Butz H, Liko I, Racz K, Patocs A. Modulation of the circadian clock by glucocorticoid receptor isoforms in the H295R cell line.

Steroids 2016; 116:20-27 **IF:2,51**

Nagy Zs., Rác K., Patócs A. A perifériás cirkadián órák jelentősége az anyagcserezavarok kialakulásában.

Magyar Belorvosi Archívum 2014; 67(6) 374-380

Szapannos A, **Nagy Z**, Kovács B, Poór G, Tóth M, Rác K, Kiss E, Patócs A. Tissue-Specific Glucocorticoid Signaling May Determine The Resistance Against Glucocorticoids In Autoimmune Diseases.

Curr Med Chem. 2015; 22(9): 1126-1135 **IF:3,45**

Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke:

Igaz I, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, **Nagy Z**, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A. Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin.

Int J Endocrinol. 2015;2015:589230 **IF:2,37**

Kacso G, Ravasz D, Doczi J, Nemeth B, Madgar O, Saada A, Ilin P, Miller C, Ostergaard E, Iordanov I, Adams D, Vargado Z, Araki M, Araki K, Nakahara M, Ito H, Gal A, Molnar MJ, **Nagy Z**, Patocs A, Adam-Vizi V, Chinopoulos C: Two transgenic mouse models for beta subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations.

Biochem J 2016; 473(20):3463-3485 **IF:3,56**

XI. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Rácz Károly professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy a II. számú Belgyógyászati Klinika Endokrin Genetikai Laborjában dolgozhassak és szakmai tudásával, kitartásával, emberségével példát mutatott számomra az orvosi hivatáshoz. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Patócs Attilának, aki még TDK hallgatóként felkeltette érdeklődésemet a kutatás iránt, és akinek mindennapos segítsége, tanácsai és személyes támogatása nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat. Köszönöm Dr. Igaz Péter egyetemi docens úrnak, a II. Belgyógyászati Klinika jelenlegi, valamint Tóth Miklós professzor úrnak a II. Belgyógyászati Klinika előző igazgatójának a lehetőséget, hogy a II. Belgyógyászati Klinikán végezhettem PhD tanulmányaimat. Köszönöm a Klinikai Orvostudományi Iskola előző, Dr. Tulassay Zsolt professzor úrnak, és jelenlegi programvezetőjének Dr. Tulassay Tivadar professzor úrnak, hogy PhD tanulmányaimat a Semmelweis Egyetemen végezhettem. Köszönettel tartozom Dr. Likó Istvánnak a molekuláris biológiai vizsgálatok megtervezésében, kivitelezésében és értékelésében nyújtott magas szintű szakmai segítségéért. Köszönetemet fejezem ki Krauszné Vaczula Máriának, aki megtanított a precíz laboratóriumi munka alapjaira. Köszönöm a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai munkacsoportjának, Dr. Butz Henriettnek, Dr. Mészáros Katalinnak, Dr. Karvaly Gellértnek, Dr. Doleschall Mártonnak, Dr. Nyíró Gábornak, Benkő Mariannak és az Endokrinológiai és Izotóp labor valamennyi munkatársának, hogy segítségükkel és tanácsaikkal hozzájárultak dolgozatom elkészültéhez. Köszönöm a Semmelweis I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézet munkatársainak, elsősorban Dr. Kovalszky Ilonának, Dr. Baghy Kornéliának, Dr. Paku Sándornak és Csorba Gézané Maricának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségüket. Köszönetet szeretnék mondani a molekuláris labor valamennyi volt és jelenlegi PhD hallgatójának, külön köszönöm Dr. Ács Bencének, Dr. Feldman-Kovács Karolinának, Dr. Szappanos Ágnesnek, Dr. Szabó Péternek, Dr. Molnár Ágnesnek, Dr. Koncz Klárának, Németh Kingának, Dr. Grolmusz Vincének, Dr. Nagy Zoltánnak, Dr. Perge Pálnak és Márta Alexa TDK hallgatónak a laborban kialakított baráti légkört, a mindennapokban nyújtott segítséget és javaslatokat. Köszönettel tartozom családomnak és menyasszonyomnak türelmükért és támogatásukért.